

**LİKEN ASİTLERİNİN
ULTRAVİYOLE IŞINLARA KARŞI
KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Mehmet VAROL
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Ocak - 2013

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 1106F116**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mehmet VAROL' un “**Liken Asitlerinin Ultraviyole Işınlarına Karşı Koruyucu Etkisinin İncelenmesi**” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 10.01.2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı – Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı):	Doç.Dr. AYŞE TANSU KOPARAL	
Üye	: Prof.Dr. HÜLYA SİVAS	
Üye	: Doç.Dr. MİRİŞ DİKMEN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LİKEN ASİTLERİNİN ULTRAVİYOLE IŞINLARINA KARŞI KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Mehmet VAROL

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

2013, 94 sayfa

Yaşadığımız çağın en büyük problemlerinden biri ozon tabakasındaki delinme sonucu artan deri kanseri vakaları gibi gözükmemektedir. Deri kanseri açık tenli popülasyonlarda en sık rastlanan kanser tipidir. Bu nedenle, UV-B ışınlarına karşı doğal ve sentetik koruyucu faktörlerin keşfi ve sentezi önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında, UV-B ışınlarını absorbe etme potansiyeline sahip olan (-)- usnik asit, atranorin, giroforik asit ve vulpinik asit gibi liken asitlerinin, insan keratinosit hücrelerini (HaCaT), 2,5 J/cm² UV-B ışınına karşı koruyucu aktiviteleri MTT, LDH, ROS testleri ve DAPI, TRITC-phalloidin boyama yöntemleri gibi *in vitro* yöntemlerle araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, sırasıyla vulpinik asit, giroforik asit, atranorin ve (-)- usnik asit HaCaT hücrelerini UV-B ışınlarına karşı koruyucu özellikte bileşikler olarak tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Liken asitleri, UV-B, MTT, LDH, ROS, DAPI, aktin filament

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECT OF LICHEN ACIDS AGAINST ULTRAVIOLET RAYS

Mehmet VAROL

Anadolu University

Graduate School of Science

Biology Program

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL

2013, 94 pages

One of the biggest problems of our era seems to be the increasing incidence of skin cancer as a result of perforation in the ozone layer. Skin cancer is the most common type of cancer in fair-skinned populations. Therefore, discovery and synthesis of natural and synthetic protection factors against UV-B rays are important.

In this thesis study, the protective activities to human keratinocyte cells (HaCaT) against 2,5 J/cm² UV-B radiation of the lichen acids such as (-)- usnic acid, atranorin, gyrophoric acid and vulpinic acid compounds which have potential to absorb UV-B rays were investigated by *in vitro* methods such as MTT, LDH, ROS assays and DAPI, TRITC-phalloidin staining methods. As a result of the studies, respectively vulpinic acid, gyrophoric acid, atranorin, (-)- usnic acid were defined as capable of protecting HaCaT cells against UV-B radiations.

Keywords: Lichen acids, UV-B, MTT, LDH, ROS, DAPI, actin filament

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim süresinde laboratuvarını bana açarak hücre kültürü tekniklerini bizzat kendisi öğretene, ihtiyaç duyduğum her zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, içten, sevecen ve dürüstlüğüyle öğrencilerinin içini ısıtan sevgili hocam Doç.Dr. Ayşe Tansu KOPARAL' a,

Yüksek lisans eğitimim sırasında tanışma imkânı bulduğum, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, insanları anlamaya önem veren ve zaman ayıran Sayın Prof.Doç.Dr. Kadriye BENKLİ' ye,

Tez çalışmamda kullandığım likenleri toplayan ve tayin eden Doç.Dr. Mehmet CANDAN' a ve Prof.Doç.Dr. Ayşen TÜRK' e,

Liken asitlerini, likenlerden izole ederek saflaştıran Doç.Dr. Turgay TAY' a,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan, yol gösteren ve yön veren bütün hocalarıma, araştırma görevlilerine ve bölüm çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu süreç boyunca hep yanımda olan annem Döne VAROL' a ve kardeşim Ayşegül VAROL' a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Babam Alaattin VAROL'a, anneme ve kardeşime...

Mehmet VAROL

Ocak, 2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Likenler	1
1.2. Liken Asitlerinin Biyolojik Aktiviteleri	6
1.2.1. Allelopatik aktiviteler	6
1.2.2. Metal dengesi ve kirliliğe tolerans üzerine aktiviteler	7
1.2.3. Antiherbivor ve insektisidal aktiviteler.....	8
1.2.4. Antimikrobiyal aktivite	8
1.2.5. Ultraviyole ışınlar karşı koruyucu aktivite	9
1.2.6. Antioksidan aktivite.....	11
1.2.7. Sitotoksik ve antitumoral aktivite	14
1.2.8. Antiviral aktivite	15
1.2.9. Alerjen aktivite	15

1.2.10. Antipiretik ve analjezik aktivite	15
1.3. Çalışmada Kullanılan Liken Asitleri	15
1.3.1. (-)- Usnik asit.....	15
1.3.2. Atranorin	17
1.3.3. Vulpinik asit	18
1.3.4. Giroforik asit	18
1.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı	19
1.4.1. HaCaT hücre hattı.....	19
1.5. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	20
1.5.1. Hücrelerin UV-B ışınlarına maruz bırakılması.....	20
1.5.2. Mitokondrial aktiviteye dayalı MTT testi	21
1.5.3. Laktat dehidrojenaz (LDH) aktivite ölçümü.....	22
1.5.4. Reaktif oksijen türleri (ROS) birikiminin ölçümü	23
1.5.5. TRITC-phalloidin boyama	24
1.5.6. DAPI [4,6-diamidino-2-fenilindole, dihidroklorit] boyama	25
2. MATERYAL VE YÖNTEM	26
2.1. Liken Asitlerinin İzolasyon Yöntemleri.....	26
2.1.1. (-) - Usnik asit bileşiğinin izolasyonu	26
2.1.2. Atranorin bileşiğinin izolasyonu	26
2.1.3. Vulpinik asit bileşiğinin izolasyonu	27

2.1.4. Giroforik asit bileşığının izolasyonu.....	27
2.2. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması.....	28
2.3. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması.....	28
2.4. Çalışmada Kullanılan Hücreler	28
2.4.1. HaCaT hücre kültürü.....	28
2.5. Hücrelerin Testler İçin Hazırlanması.....	29
2.5.1. Genel deney yöntemi	29
2.5.1.1. Doksan altı kuyucuklu plakalarda uygulanan yöntem.....	29
2.5.1.2. On iki kuyucuklu plakalarda uygulanan yöntem	30
2.5.3. MTT ölçümü (<i>in vitro</i> hücre canlılığı belirleme çalışmaları)	31
2.5.4. LDH ölçümü	31
2.5.5. ROS ölçümü	32
2.5.6. TRITC-phalloidin boyama yöntemi	33
2.5.7. DAPI boyama yöntemi.....	33
3. BULGULAR	34
3.1. MTT Sonuçları (Hücre Kültürü Yoluyla <i>In Vitro</i> Sitotoksisite Belirleme Çalışmaları)	34
3.1.1. (-) - Usnik asit bileşığının HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri.....	34
3.1.2. Atranorin bileşığının HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri.....	36

3.1.3. Vulpinik asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri.....	37
3.1.4. Giroforik asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri.....	38
3.2. Laktat Dehidrogenaz Testi (LDH) Sonuçları	39
3.2.1. (-) - Usnik asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri.....	40
3.2.2. Atranorin asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri.....	41
3.2.3. Vulpinik asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri.....	42
3.2.4. Giroforik asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri.....	43
3.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Süpürücü Aktivite Testi Sonuçları	44
3.3.1. Vulpinik asit bileşiminin ROS süpürücü aktivitesi.....	44
3.4. TRITC Phalloidin Boyama Yöntemi Sonuçları	45
3.4.1. (-) - Usnik asidin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi.....	45
3.4.2. (-) - Usnik asit bileşiminin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin f-aktin komponentleri üzerinden incelenmesi.....	47
3.4.3. Atranorin bileşiminin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi.....	49

3.4.4. Atranorin bileşiminin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin f-aktin komponentleri üzerinden incelenmesi.....	51
3.4.5. Vulpinik asidin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi.....	53
3.4.6. Vulpinik asit bileşiminin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin f-aktin komponentleri üzerinden incelenmesi.....	55
3.4.7. Giroforik asidin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi.....	57
3.4.8. Giroforik asit bileşiminin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin f-aktin komponentleri üzerinden incelenmesi.....	59
3.5. DAPI Boyama Yöntemi Sonuçları	61
3.5.1. (-)- Usnik asidin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi.....	62
3.5.2. (-)- Usnik asit bileşiminin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin genetik materyal üzerinden incelenmesi.....	64
3.5.3. Atranorin bileşiminin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi.....	66
3.5.4. Atranorin bileşiminin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin genetik materyal üzerinden incelenmesi.....	68
3.5.5. Vulpinik asidin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi.....	70

3.5.6. Vulpinik asit bileşiminin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin genetik materyal üzerinden incelenmesi.....	72
3.5.7. Giroforik asidin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi.....	74
3.5.8. Giroforik asit bileşiminin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin genetik materyal üzerinden incelenmesi.....	76
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	78
KAYNAKLAR.....	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Tallus yapısı (TEM) – (A), homeomerik tallus; (B), heteromerik tallus.....	2
1.2. Heteromerik bir likenin; (A) diyagramı (B) stereo mikroskopik kesiti.....	3
1.3. Liken metabolitlerinin kompleks sentez yolları	5
1.4. Reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidanlar arasındaki denge	11
1.5. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) kaynakları ve hücrel cevaplar	13
1.6. Usnik (a) ve izousnik (b) asit metabolitlerinin kimyasal yapıları	16
1.7. Atranorin metabolitinin kimyasal yapısı.....	17
1.8. Vulpinik asit metabolitinin kimyasal yapısı	18
1.9. Giroforik asit metabolitinin kimyasal yapısı	19
1.10. Canlı hücreler tarafından MTT'nin formazan tuzuna metabolizasyonu	21
1.11. Laktat dehidrojenaz (LDH) aktivite testi reaksiyon diyagramı	22
1.12. Hücre içi ROS birikiminin DCF metabolizması ile ilişkisi	24
3.1. (-) - Usnik Asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	34
3.2. Atranorin bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	36
3.3. Vulpinik Asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	37
3.4. Giroforik Asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi	38

3.5. (-) - Usnik Asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi	40
3.6. Atranorin bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi.....	41
3.7. Vulpinik Asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi	42
3.8. Giroforik Asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi	43
3.9. Vulpinik Asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi	44
3.10. (-) - Usnik asit bileşiminin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi	46
3.11. (-) - Usnik asit bileşiminin 2,5 J/cm ² UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi	48
3.12. Atranorin bileşiminin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi	50
3.13. Atranorin bileşiminin 2,5 J/cm ² UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi	52
3.14. Vulpinik asit bileşiminin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi	54
3.15. Vulpinik asit bileşiminin 2,5 J/cm ² UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi	56
3.16. Giroforik asit bileşiminin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi	58

3.17. Giroforik asit bileşiminin 2,5 J/cm ² UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi	60
3.18. Test bileşiklerinin 358-461 nm dalga boyunda ışıma göstermesi	61
3.19. (-)- Usnik asit bileşiminin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi	63
3.20. (-)- Usnik asit bileşiminin 2,5 J/cm ² UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi	65
3.21. Atranorin bileşiminin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi	67
3.22. Atranorin bileşiminin 2,5 J/cm ² UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi	69
3.23. Vulpinik asit bileşiminin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi	71
3.24. Vulpinik asit bileşiminin 2,5 J/cm ² UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi	73
3.25. Giroforik asit bileşiminin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi	75
3.26. Giroforik asit bileşiminin 2,5 J/cm ² UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi	77

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO : Dimetil Sülfoksit

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

FBS : Fetal Bovine Serum

MTT : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür)

LDH : Laktat Dehidrojenaz

ROS : Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)

DAPI : 4',6-diamidino-2-fenilindole

PBS : Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)

EDTA : Etilenediamintetraasetik asit

1. GİRİŞ

1.1. Likenler

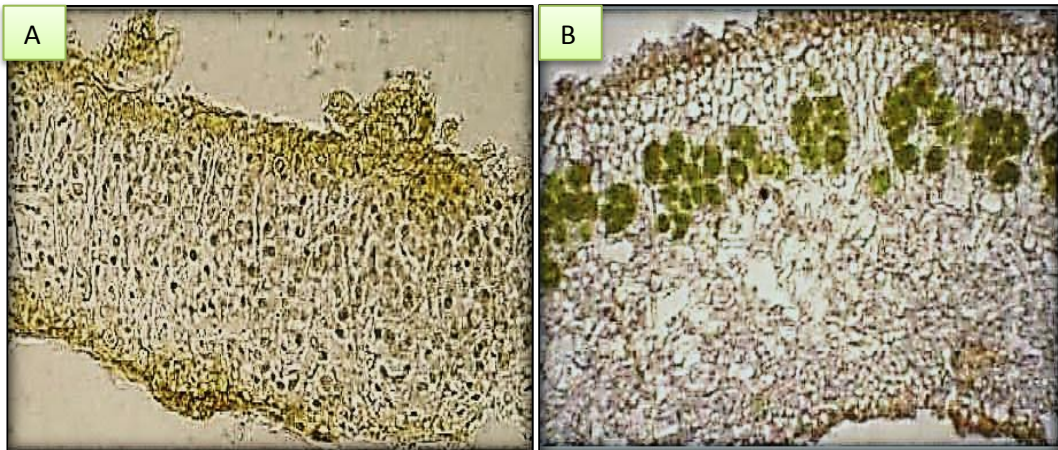
Günümüze kadar yaşayabilen en uzun ömürlü ve yaşlı organizmalar arasında ilk sıralarda yer alan likenlerin oluşumunun, yaklaşık 400 milyon yıl öncesine, paleozoik zamanın erken devoniyen dönemine denk geldiği bilinmekte ve liken benzeri ortak yaşam biçimlerinin oluşumunun 600 milyon yıl öncesine kadar dayandığı fosil kayıtlar ile kanıtlanmaktadır (Chen ve ark. 2000; Yuan ve ark. 2005). Bu uzun yaşam dönemine karşı üstün adaptasyon sağlayarak günümüze kadar varlıklarını sürdürmelerine rağmen, diğer bitki gruplarına göre az çalışılmış olmaları ilginçtir (Müller 2001; Podterob 2008).

Liken kelimesi yaklaşık iki bin yıl önce botanik biliminin babası sayılan Theophrastus tarafından ağaç kabukları üzerinde yetişen tanımlanmamış organizmalar için kullanılarak literatüre sokulmuştur. On dokuzuncu yüzyıla kadar tek bir organizma olduğu düşünülen likenler, Schwender ve Trebox' un yaptığı çalışmalarla, mantarlar ve alglerin birleşerek oluşturduğu, morfolojik ve fizyolojik bir bütünlük içinde olan, ortak yaşamlı (simbiyotik) bitkisel organizmalar olarak belirlenmiştir (Aprile ve ark. 2001). Bununla birlikte; birçok araştırmacı, likenlerin oluşturduğu simbiyotik birliktelikte mantarların daha baskın üye olduğu düşüncesindedir. Bu nedenle, likenler 1983 yılından günümüze mantarların bir yaşam formu şeklinde sınıflandırılmakta ve likenler isimlendirilirken mantarların isimlerinden yararlanılmaktadır (Boustie ve Grube 2005; Molnár ve Farkas 2010).

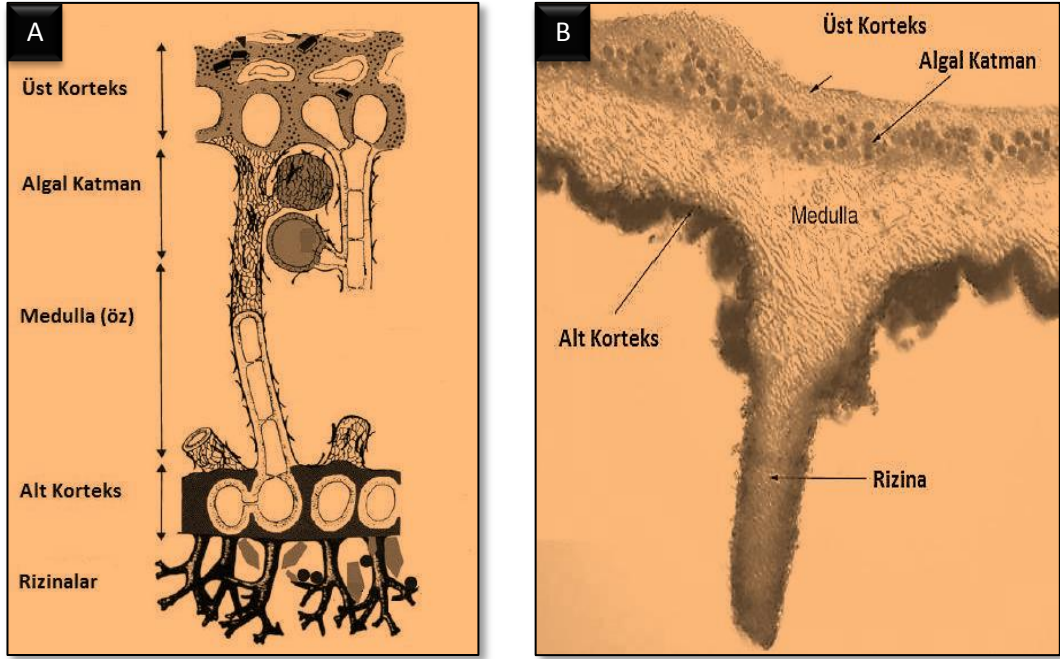
Simbiyotik organizmalar olan likenler; mikobiyont ortak olarak isimlendirilen funguslar ve fotobiyont ortak olarak isimlendirilen fotosentetik siyanobakteriler (mavi-yeşil alg) veya alglerden oluşmaktadırlar. Mikobiyont olan funguslar; *Ascomycotina* (Likenlerin yaklaşık %98'lik kısmı), *Basidiomycotina*, *Deuteromycotina* ve *Mastigomycotina* alt şubelerinden oluşmaktadır. Fotobiyont olan prokaryotik siyanobakteriler; *Nostoc*, *Gleocapsa*, *Scytonema*, *Stigonema*, *Chroococcus*, *Hyella*, *Calothrix* ve *Dichotrix* cinslerinden oluşmaktadır.

Fotobiyont olan algler ise *Chlorophyta*, *Xanthophyta* ve *Phaeophyta* şubelerinden oluşmaktadır (Müller 2001; Gilbert 2004; Boustie ve Grube 2005; Podterob 2008; Purvis ve Pawlik-Skowronska 2008). Simbiyotik yaşam biçimine adapte olmuş liken birlikteliklerinin tamamı göz önünde bulundurulduğunda; bu birlikteliklerin %80'i ökaryotik tek hücreli yeşil alglerin, %10'u iplikli yeşil alglerin, diğer %10'luk kısmı ise prokaryotik siyanobakterilerin fotobiyont ortak görevi üslenmesi ile meydana gelmektedir (Richardson 1999).

Likenler; gövde (tallus) yapılarına göre heteromerik veya homeomerik olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Mikobiyont ve fotobiyont ortaklar farklı oranlarda birleşerek bir birliktelik oluşturabilirler. Eğer simbiyotik ortakların dağılımı birbirine eşit ise basit bir yapı gösteren homeomerik liken, heterojen bir dağılım varsa heteromerik liken adını almaktadırlar (Şekil 1.1.). Heteromerik likenler homeomerik olanlara göre daha karmaşık bir yapıya sahiptirler ve farklı katmanlar gözlemlenmektedir. Bu katmanlar üst korteks (üst koruyucu katman), algal katman (fotobiyont katman), medulla (öz bölgesi), alt korteks (alt koruyucu katman) ve rizina (kök benzeri uzantı) olarak sıralanmaktadır (Şekil 1.2.). Likenler bu farklı oranlarda oluşturdukları birliktelikler sayesinde farklı yaşam koşullarına uygun şekilde yapılaşma sergileyebilmektedirler (Aprile ve ark. 2001; Józwiak ve Józwiak 2009) .



Şekil 1.1. Tallus yapısı (TEM); (A), homeomerik tallus; (B), heteromerik tallus (Aprile ve ark. 2001)



Şekil 1.2. Heteromerik bir likenin; (A) diyagramı (B) stereo mikroskobik kesiti

(Purvis ve Pawlik-Skowronska 2008; Molnár ve Farkas 2010)

Toprak, kaya ve ağaç kabukları gibi farklı ortamlar üzerinde gelişebilen likenler karasal habitatlar arasında en erken kolonileşebilmiş ve simbiyotik yaşam ortaklığı kurabilmiş organizmalardır, simbiyotik ortaklar kendi aralarında bazı fizyolojik iş bölümlerine sahiptirler. Genel olarak; liken birlikteliğini oluşturan mikobiyont üye, fotobiyont ortak için mineral, su ve karbon kaynağı sağlarken, fotobiyont üye klorofil pigmenti sayesinde fotosentez yaparak mikobiyont ortak için besin kaynağını oluşturmaktadır. Tüm dünya yüzeyinin %8'ini örten likenler, bu simbiyotik ortaklık sayesinde bitkiler için ekstrem olan çok kuru ya da çok soğuk ortamlara ve besinin düşük olduğu alanlara adaptasyon sağlamışlardır (Chen ve ark. 2000; Cocchietto ve ark. 2002; Valencia-Islas ve ark. 2007; Chooi ve ark. 2008; Valarmathi ve ark. 2009; Nybakken ve ark. 2010).

Besin zincirinin önemli aktörleri olarak görev alan likenler arktik ve antarktik tundra alanlarında baskın olarak yayılış göstermekte, bitki ekolojisinde ve karbon(C), azot (N), fosfor (P) gibi elementlerin döngüsünde kilit rol oynamaktadırlar (Purvis ve Pawlik-Skowronska 2008).

Özellikle siyanobakterilerin ortaklığında kurulan liken birliktelikleri mineral döngüsü için önemli aktörlerdir, ekolojik denge üzerine bu kadar etkili organizmalar olmalarına rağmen likenler yılda birkaç milimetreden birkaç santimetreye kadar büyüme gösterebilirler, hızlı büyüyenleri ise biokütlelerini %20-40 arttırabilirler (Dobson 2005).

Nispeten yavaş üreyen ve genelde küçük boyutlu organizmalar olan likenler yaklaşık olarak 18.500 farklı türe sahiptir ve bu sayı günden güne yeni türlerin tanımlanmasıyla artmaktadır, ülkemizdeki liken florası ise henüz yeni çalışılmaya başlanmıştır (Boustie ve Grube 2005; Halıcı ve ark. 2010). Likenlerin yavaş üremelerine rağmen çok sayıda türe sahip olmalarının nedeni ürettikleri kimyasal bileşiklerin çeşitliliği ve bu bileşiklerin aktiviteleriyle ilişkilidir. Likenlerin ürettikleri yaklaşık olarak 1050 farklı metabolit tanımlanmıştır (Müller 2001; Boustie ve Grube 2005; Stocker-Wörgötter 2008).

Likenler olağanüstü farklılık sergileyen metabolitlerini sentezlerken şikimik asit yolağı, mevalonik asit yolağı ve asetil-polimalonil yolağı gibi farklı sentez yolları izleyebilmektedir (Şekil 1.3.), (Molnár ve Farkas 2011; Stocker-Wörgötter 2008)

Likenlerin ürettikleri bileşikler, primer ve sekonder bileşikler olarak iki kısma ayrılmaktadır. Yapısal olarak diğer bitkilerin ürettikleri bileşiklere benzer özelliklere sahip olan primer metabolitler; protein, lipit, karbonhidrat ve diğer organik bileşikler gibi hücre metabolizmasında, yapısal fonksiyonlara ve rollere sahiptirler. Primer metabolitler, simbiyotik ortakların herhangi biri tarafından ya da ortaklaşa olarak sentezlenebilmektedir (Türk ve ark. 2003). Sekonder metabolitlerin görevleri ise henüz tam olarak netleşmemiştir; ancak çeşitli koruyucu görevler üstlendikleri ve fotosenteze dahil olabildikleri bilinmektedir. Likenlerin ürettikleri 250 den fazla sekonder metabolitin yapısı aydınlatılmış ve bunlardan 75 tanesinin likenlere özgü olduğu tespit edilmiştir (Müller 2001; Podterob 2008; Stocker-Wörgötter 2008).

1.2. Liken Asitlerinin Biyolojik Aktiviteleri

Likenlerden izole edilen sekonder metabolitler; geniş kimyasal çeşitliliğe sahip olmalarıyla ve farklı biyoaktiviteleri nedeniyle, asırlardır değişik kullanım alanlarına girme imkanı bulmuşlardır. Bu nedenle likenlerden izole edilen asitlerin miktarını artırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Chooi ve ark. 2008); ancak yaygın ticari kullanım sadece usnik asit için yapılmaktadır. Bununla birlikte, likenlerin geleneksel kullanımı özellikle Asya ülkelerinde devam etmekteyken, liken asitlerinin geniş fayda yelpazesine sahip olmaları ve yenilerinin keşfedilmesiyle ticari kullanıma sunumlarının artacağı düşünülmektedir (Boustie ve Grube 2005). Liken asitlerinin biyolojik aktiviteleri farklı kategorilere ayrılarak incelenebilmektedir.

1.2.1. Allelopatik aktiviteler

Allelopati; bitki, alg, bakteri ve mantarlar tarafından sentezlenebilen sekonder metabolitlerin herhangi bir biyolojik sistemin büyümesini ve gelişmesini engelleyici süreç olarak tanımlanmaktadır. Allelopatide amaç; diğer organizmaların gelişimini engelleyerek kendine daha fazla gelişim alanı sağlayabilmek veya daha fazla kaynağa tek başına ulaşabilmek olarak basitçe tarif edilebilmektedir (Macias ve Molinillo 2007).

Bazı liken asitleri de allelopatik aktiviteye sahiptirler ve bu asitler allelopatik asitler veya allelokimyasallar olarak anılmaktadırlar (Macias ve Molinillo 2007; Molnár ve Farkas 2010; Molnár ve Farkas 2011). Allelokimyasallar diğer organizmaların fotosentez mekanizmaları, solunum ve transpirasyon mekanizmaları, protein ve nükleik asit sentezleri, hücre zarı geçirgenliği ve iyon transferi üzerine etkili olabilmektedirler (Macias ve Molinillo 2007; Molnár ve Farkas 2010). Liken asitlerinin allelopatik etkileri üzerine yapılan çalışmalar; vulpinik ve evernik asitlerin, *Caloplaca citrina* ve *Graphis scripta* askosporlarının çimlenmesini inhibe ettikleri, ancak stiktik asidin etkilemediği; 4-O-metil evernik ve squamatik asitlerin ise bazı yosun sporlarının gelişimini durdurduğu belirlenmiştir.

Ayrıca, *Cladonia cristatella*'nın sporlarının çimlenmesi, evernik ve stiktik asit tarafından engellenmektedir. Atranorin ise *Caloplaca citrina* sporlarının çimlenmesini tamamen engellemektedir. Birçok liken türünün gelişim yüzeyi, ışık, su ve besin eldesi amacıyla allelopatik etkilere sahip oldukları bilinmekte, fakat hangi sekonder bileşiklerin etkili olduğu ve tam etki mekanizmaları henüz bilinmemektedir (Armstrong ve Welch 2007; Molnár ve Farkas 2010).

1.2.2. Metal dengesi ve kirliliğe tolerans üzerine aktiviteler

Ağır metaller ve hava kirliliği gibi faktörler bitki ve mantarların gelişimini etkilemektedir. Likenler ise gelişimlerini devam ettirebilmek için sekonder metabolitler aracılığıyla bir savunma sistemi oluşturmuş ve yaşamlarını ağır koşullar altında devam ettirebilmektedirler (Boustie ve Grube 2005; Purvis ve Pawlik-Skowronska 2008; Józwiak ve Józwiak 2009; Molnár ve Farkas 2010). Liken sekonder metabolitleri ağır metal birikimine karşı hassastırlar ve bu hassasiyet türe özgüdür (Molnár ve Farkas 2010). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; *Hypogymnia physodes*'den izole edilen sekonder metabolitlerden; atranorin, fisodik asit, fisodalik asit ve protosetrarik asidin, liken hücre zarından Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının absorpsiyonunu engellediği Fe^{+3} iyonunun ise absorpsiyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir (Molnár ve Farkas 2010). Ayrıca; krom, fosfor ve sülfür içerikli bileşikler sentezleyen bitkilerin yakınında bulunan likenlerde atranorin, fisodik asit ve hidroksifisodik asidin miktarının azaldığı tespit edilmiştir (Molnár ve Farkas 2010; Molnár ve Farkas 2011). Dibenzofuran usnik asit ve divarikatik asitin ise hücreler arası Cu^{+2} ve Mn^{+2} iyonlarının seviyesini arttırdıkları tespit edilmiştir (Hauck ve ark. 2009). Elde edilen bilgiler göstermiştir ki; liken asitleri metal dengesini sağlamakta da görevlidirler (Boustie ve Grube 2005; Purvis ve Pawlik-Skowronska 2008; Hauck ve ark. 2009; Molnár ve Farkas 2010; Kováčik ve ark. 2011;). Bunların dışında, likenler yüzeylerinde veya hücrelerinde biriktirdikleri; ağır metaller, radyonüklidler, polinükleer aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve poliklorlu biyofeniller (PCB) ile biyoindikatör olarak kullanılabilmektedirler (Aprile ve ark. 2001; Józwiak ve Józwiak 2009).

1.2.3. Antiherbivor ve insektisidal aktiviteler

Likenlerin besin içeriklerinin az olması nedeniyle herbivor veya insektler tarafından beslenme amacıyla kullanımlarına az rastlanmakla birlikte sahip oldukları sekonder bileşiklerin bir savunma sistemi olarak görev gördüğü tespit edilmiştir (Molnár ve Farkas 2010).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; *Spodoptera littoralis* türünün polyphagous larvalarına karşı (+) – ve (-) – usnik asit bileşikleri, akut toksik ve beslenmeyi engelleyici etkiye sahiptir (Molnár ve Farkas 2011). Ayrıca; Çetin ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı çalışmaya göre (+) – usnik asit, vulpinik asit, giroforik asit, 3-hidroksifisodik asit ve atranorin bileşikleri *Culiseta longiareolata*'nın larvalarına karşı larvasidal aktiviteye sahiptir.

Likenlerin antiherbivor ve insektisidal aktiviteye sahip olmalarının önemi ise bitkilerden izole edilen bileşiklerin, sentetik kimyasallara göre çok daha az etkili olmaları nedeniyledir. Sentetik kimyasallar doğada geri dönüşümü olmayan bozulmalara neden olurken doğal kimyasallar bu durumun önüne geçebilmektedir. Dolayısıyla likenlerden elde edilen sekonder bileşiklerin gelecek vadede birer insektisidal ve antiherbivor özelliğe sahip olmaları biyolojik anlamda önem arz etmektedir (Guo ve ark. 2008; Molnár ve Farkas 2010; Molnár ve Farkas 2011; Cetin ve ark. 2012).

1.2.4. Antimikrobiyal aktivite

Mikroorganizmaların farmakolojik ajanlara karşı direnç geliştirmeleri nedeniyle antimikrobiyal ajanların önemi her geçen gün artmaktadır. Likenlerden izole edilen sekonder metabolitlerin büyük bir kısmı belki de ekolojik rekabet için önemli olan allelopatik özellikleri nedeniyle fungus, bakteri ve diğer mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkilere sahiptirler (Lauterwein ve ark. 1995; Türk ve ark. 2003; Boustie ve Grube 2005; Molnár ve Farkas 2010)

Sekonder metabolitlerin antimikrobiyal etkileri üzerine yapılan çalışmalar; atranorin, (+)- ve (-)- usnik, stiktik, protosetrarik, fisodik, lekanorik, fumarprotosetrarik, giroforik, protolikesterinik, evernik ve vulpinik asit gibi liken asitlerinin antimikrobiyal etkilere sahip olduğunu göstermiştir (Lauterwein ve ark. 1995; Müller 2001; Türk ve ark. 2003; Boustie ve Grube 2005; Podterob 2008; Molnár ve Farkas 2010; Molnár ve Farkas 2011). Ayrıca, bazı liken ekstraktlarının de antimikrobiyal etkileri tespit edilmiş, fakat hangi liken asitlerinin etkili olduğu çalışılmamıştır (Podterob 2008). Liken asitlerinden atranorin, fisodik ve usnik asidin ise bazı metabolik enzimler üzerine güçlü bir şekilde inhibe edici aktivite gösterdiği bulunmuştur (Podterob 2008).

1.2.5. Ultraviyole ışınlar karşı koruyucu aktivite

Güneşten gelen zararlı ultraviyole ışınlarının yaklaşık %90'ının dünyaya ulaşması koruyucu ozon tabakası tarafından önlenmektedir. Solar UV ışınları temel olarak UV-C ($\lambda = 100\text{--}290\text{ nm}$), UV-B ($\lambda = 290\text{--}320\text{ nm}$) ve UV-A ($\lambda = 320\text{--}400\text{ nm}$) olarak üç kısma ayrılmaktadır. UV-C ışınlarının tamamı ozon tabakası tarafından tutulurken UV-A ve UV-B ışınlarının bir kısmı geçebilmektedir (Scharffetter ve ark. 1991). Soğutma ve klima uygulamalarında kullanılan kloroflorokarbon (CFC) ve hidrokloroflorokarbonlar (HCFC) atmosfere verildikten sonra difüzyon ve atmosferdeki rüzgarların etkisiyle yukarı doğru yükselirler. Özellikle CFC'lerin kimyasal kararlılıkları çok fazla olduğu için yapıları bozulmadan atmosferde yüz yıldan uzun bir süre kalabilirler. CFC'ler kimyasal kararlılıkları sayesinde ozon tabakasının bulunduğu yukarı stratosfere (mezosfer) kadar yükselir ve ozon tabakasının delinmesine sebep olurlar (Onat ve ark. 2004).

Ozon tabakasının delinmesiyle dünyaya daha fazla ulaşan ultraviyole ışınlar, bütün canlı organizmalar üzerinde ciddi problemlere neden olmaktadır. Ozon tabakasındaki açığın %1 oranında artması, dünyaya gelen zararlı ultraviyole ışınların %2 oranında artmasına neden olmaktadır. Birleşmiş Milletler çevre programı raporuna göre ozon tabakasındaki açığın %10 artması deri kanseri vakalarını %26 artırmaktadır (Onat ve ark. 2004; Narayanan ve ark. 2010).

UV-A ve UV-B ışınlarının DNA, protein ve lipitler üzerinde foto-oksidatif hasarlara neden olduğu ve yoğun olarak DNA yapısındaki siklobütan primidin dimerlerin (CPDs) yapısını bozarak mutasyonlara neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, derideki dermis tabakası tarafından absorbe edilen bu ışınların kollojen ve fibroblast yapısını bozduğu kanıtlanmıştır (Scharffetter ve ark. 1991; Onat ve ark. 2004; Narayanan ve ark. 2010). Bununla birlikte, UV-B ışınlarının hayvanlarda ve insanlarda ki deri kanseri olgularına neden olan en etkili ışın olduğu da deneysel olarak kanıtlanmıştır (Ichihashi ve ark. 2003; Narayanan ve ark. 2010).

Yapılan çalışmalar farklı organizmaların UV ışınlarına karşı farklı mekanizmalar geliştirerek adaptasyon sağladığını göstermiştir (Cockell ve Knowland 1999). Likenlerin; UV ışınlarına karşı koruyucu sekonder metabolitler sentezlemeleri, likenlerin dünya üzerinde varoluş tarihiyle ilgili bir durumdur, çünkü liken benzeri yapılar altı yüz milyon yıl önce dünya üzerinde yayılış göstermeye başlamışlardır. Altı yüz milyon yıl önce UV-B ışınlarının dünya yüzeyine ulaşımı, ozon tabakasının durumu nedeniyle, şu anda ulaşan miktardan çok daha fazla olduğu için likenler UV-B ışınlarına karşı koruyucu bir mekanizma geliştirmek zorunda kalmışlardır (Yuan ve ark. 2005).

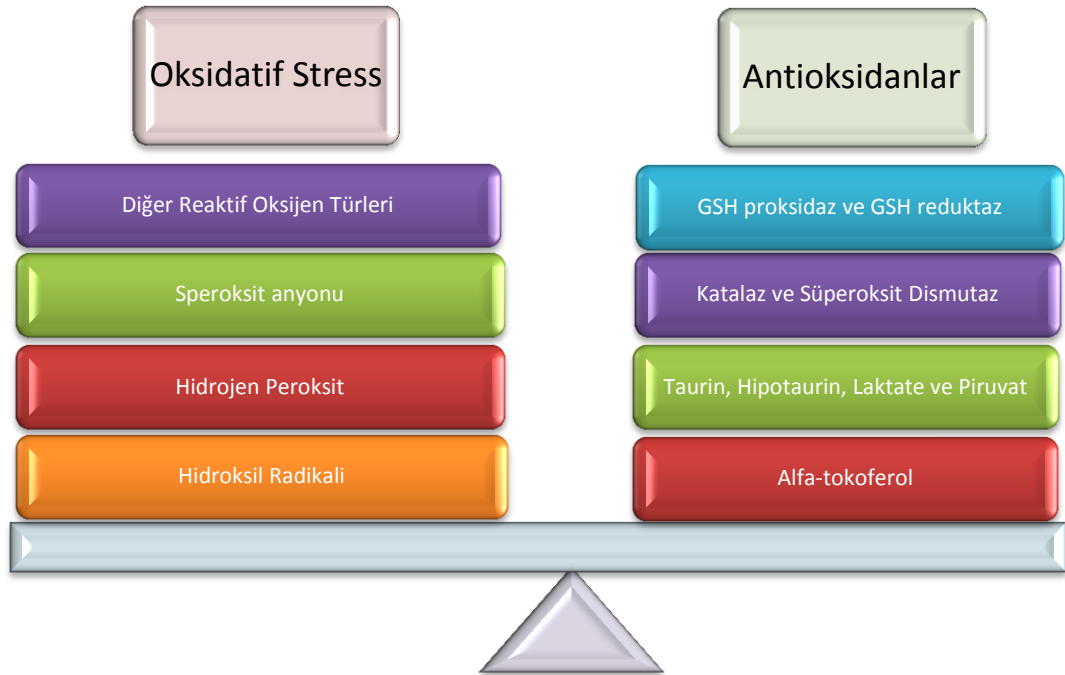
UV-B ışınları, fotosentezi inhibe edici ve DNA üzerine olan etkileriyle, liken birlikteliğinin devamlılığını tehlikeye sokmaktadır, bu nedenle mikobiyont ortak tarafından korteks yüzeyi sekonder UV-B absorblayıcı metabolitlerle kaplanarak fotobiyont ortağı koruyucu bir filtre sistemi oluşturulmaktadır (Molnár ve Farkas 2010).

Likenlerden tarafından sentezlenen sekonder metabolitler, kimyasal yapılarında benzen halkasına bağlı bir karbonil grup ve en az bir tane ortohidroksil grup içerir ki sahip oldukları bu kimyasal yapıları ile UV ışınlarına karşı bir filtre görevi görürler (Fernández ve ark. 1998; Hidalgo ve ark. 2002).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; kalisin, rizokarpik asit, parietin, pinastrik asit, melanin, usnik asit gibi sekonder liken metabolitlerinin sahip oldukları kimyasal yapı ve UV ışınlarını absorblama özellikleri ile sekonder metabolitlerin UV ışınlarına karşı koruyucu etkiye sahip olabilecekleri belirlenmiştir (Hidalgo ve ark. 2002; Solhaug ve ark. 2003; Nybakken ve Julkunen-Tiitto 2006; Molnár ve Farkas 2010; Molnár ve Farkas 2011).

1.2.6. Antioksidan aktivite

Serbest radikaller (süperoksitler, hidroksil radikali vs.) hücre dengesini sağlama, elektron transferi, enerji üretimi, fotosentez ve birçok hücre içi kimyasal süreç için önem arz etmektedir. Ancak, hücre içindeki reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarı ile antioksidan bileşiklerin miktarı arasında denge bulunmalıdır (Şekil 1.4.). Aksi durumda; protein denaturasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA hasarları gibi hücre içi problemler oluşmaktadır (Koç ve Üstün 2008; Molnár ve Farkas 2010; Tsuda 2012).



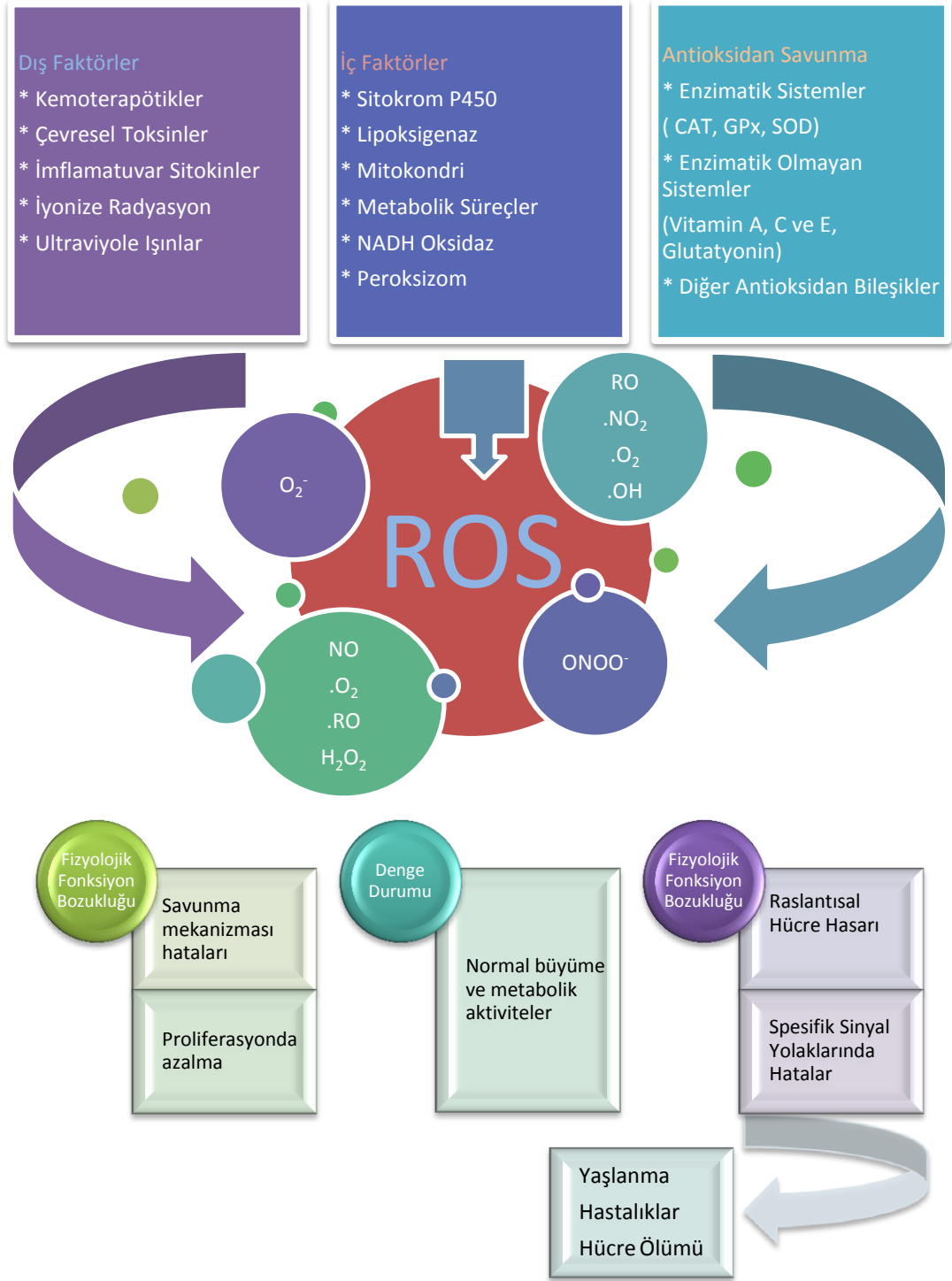
Şekil 1.4. Reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidanlar arasındaki denge (Tsuda 2012)

Atomik ya da moleküler yapıdaki kimyasalların bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan durumları serbest radikal olarak adlandırılmaktadır. Bu durumda moleküller başka moleküllerle çok kolay bir şekilde elektron alış verişine girmektedirler ve oksidan moleküller ya da reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılmaktadırlar (Koç ve Üstün 2008).

Normal koşullar altında, mitokondri ve peroksizom gibi organeller; hücre içi metabolik faaliyetlerde kullanılmak üzere az miktarda reaktif oksijen türlerini oluşturmaktadır. Hava kirliliği, UV ışınları, toksik bileşikler gibi hücreleri strese sokabilecek durumlarda bu oksidan bileşikler artarak proteinlere, nükleik asitlere ve hücre zarındaki yağ asitlerine bağlanma eğilimine girmektedir. ROS bileşiklerinin bu aktiviteleri ise hücre dengesinde bozulmaya neden olarak; mutasyonlara, hücre metabolizmasında bozulmalara, hücre zarında farklılıklara neden olmakta ve hücrenin normal işlevlerini yerine getirmesini engellemekte; yaşlanma, kanser, Alzheimer, Parkinson gibi hastalıklara neden olabilmektedir (Şekil 1.5.), (Koç ve Üstün 2008; Molnár ve Farkas 2010; Tsuda 2012).

Reaktif oksijen türlerine karşı hücre tarafından oluşturulan savunma mekanizması enzimatik ve enzimatik olmayan olarak iki kısımda incelenen antioksidanlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Enzimatik antioksidanlar; katalaz enzimi (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon s-transferaz enzimlerinden, enzimatik olmayan antioksidantlar ise selenyum, çinko gibi mineraller, vitamin A, C, E, koenzim Q10, melatonin hormonu, bazı karotenoidler, flavonoidler ve tanninlerden oluşmaktadır (Koç ve Üstün 2008).

Yapılan araştırmalara göre; likenler tarafından sentezlenen sekonder metabolitler, özellikle fenolik grupları sayesinde reaktif oksijen türlerini süpürücü etkiye sahiptirler (Valencia-Islas ve ark. 2007; Molnár ve Farkas 2010; Molnár ve Farkas 2011). Çeşitli çalışmalarda liken asitlerinden, atranorin, divarikatik asit, usnik asit, pannarin, 1-kloropannarin, giroforik asit ve sphaerophorin metabolitlerinin ROS süpürücü etkileri gösterilmiştir (Valencia-Islas ve ark. 2007; Russo ve ark. 2008; Molnár ve Farkas 2010; Bačkorová ve ark. 2012).



Şekil 1.5. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) kaynakları ve hücresel cevaplar (Tsuda 2012)

1.2.7. Sitotoksik ve antitümöral aktivite

Likenlerden elde edilen sekonder metabolitlerin sahip olduğu birçok aktivitenin keşfedilmesiyle, bu inanılmaz özelliklere sahip olan asitlerin sitotoksik ve antikanserojen ajanlar olabilme ihtimali araştırma konusu olmuştur. Likenlerden elde edilen ekstrelerin tümör hücreleri üzerine sitotoksik etkiler göstermesi de bu düşüncenin güçlenmesini sağlamıştır (Molnár ve Farkas 2010; Molnár ve Farkas 2011).

Likenlerden elde edilen sekonder metabolitlerin sitotoksik ve antitümöral etkileri gün geçtikçe daha çok dikkat çeken bir konu olmaktadır. Yapılan çalışmalara göre; (+) – usnik asit bileşiğinin fare gastrik hepatositlerine karşı, hücrelerde oksidatif stres oluşturarak güçlü hepatotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Bačkorová ve ark. 2011). (+)- ve (-)- usnik asit bileşiklerinin ise çeşitli kanser hücrelerine karşı antikanserojen ve apoptotik ajan aktiviteleri gözlemlenmiştir (Koparal ve ark. 2006; Bačkorová ve ark. 2012). Ayrıca; atranorin, parietin, giroforik asit, diffraktaik asit gibi sekonder metabolitlerin güçlü sitotoksik ve antitümöral aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Kumar ve Müller 1999; Boustie ve Grube 2005; Koparal ve ark. 2006; Burlando ve ark. 2009; Bačkorová ve ark. 2011; Bačkorová ve ark. 2012). Bununla birlikte vulpinik asit, salazinik asit gibi bazı sekonder metabolitlerin düşük toksisiteye sahip oldukları bulunmuştur (Ingólfssdóttir ve ark. 2002; Burlando ve ark. 2009). Koparal ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada ise liken asitlerinden olivetorik asidin antianjiyojenik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Liken asitlerinden usnik asitin, insan göğüs kanseri ve akciğer kanseri hücreleri üzerine DNA hasarı oluşturmaksızın, antiproliferatif etki göstermesi, bu metabolitin geleceğin genotoksik olmayan antikanserojen ajanı olarak görülmesine neden olmuştur. Çünkü terapötik kimyasal bir ajanın genotoksik özellikte olmaması, tedavi sonrası yeniden habis tümör oluşumu riskini ortadan kaldırmaktadır (Molnár ve Farkas 2010).

1.2.8. Antiviral aktivite

Liken asitleri üzerine yapılan çalışmalar, bu sekonder metabolitlerin antiviral aktivitelere de sahip olduklarını göstermiştir. On yedi farklı depside ve depsidone HIV integrası ve farmakoforu üzerine çalışılmış ve çeşitli baskılayıcı etkiler göstermişlerdir (Boustie ve Grube 2005). Usnik asit, Junin virüsü ve Tacarabe virüslerine karşı antiviral aktivite göstermiş, parietin metabolitinin ise bazı virüslere karşı virüsidal aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (Molnár ve Farkas 2010; Molnár ve Farkas 2011).

1.2.9. Alerjen aktivite

Liken asitlerinin temas veya hava yoluyla akut dermatite neden olabildiği tespit edilmiştir. İncelenen vakalarda oluşan dermatitin liken asitleri kaynaklı olduğu ve ışığa duyarlı dermatit oluşturabileceği belirlenmiştir. Atranorin, usnik asit, lobarik asit ve stiktik asidin etkili olabileceği gözlemlenmiştir (Aalto-Korte ve ark. 2005; Molnár ve Farkas 2010; Molnár ve Farkas 2011).

1.2.10. Antipiretik ve analjezik aktivite

Hayvanlar üzerine yapılan deneylerde bazı likenlerin ağrı kesici, ateş düşürücü etkileri gözlemlenmiş ve bu etkilerin insanlarda da benzer olacağı tahmin edilmiştir. (+) – usnik asidin ağrı kesici ve ateş düşürücü etkiye sahip olduğu, diffraktaik asitin ise ağrı kesici etkileri belirlenmiştir (Boustie ve Grube 2005; Molnár ve Farkas 2010)

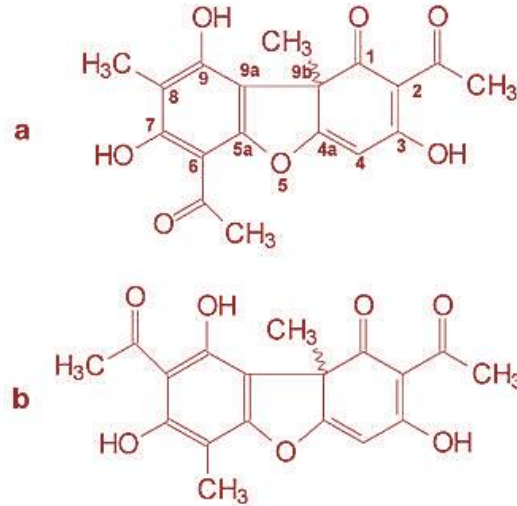
1.3. Çalışmada Kullanılan Liken Asitleri

1.3.1. (-)- Usnik asit

Likenlerden izole edilen sekonder bileşikler arasında çeşitli biyolojik aktiviteler göstermesi nedeniyle en çok çalışılan liken asidi olan usnik asit kimyasal yapı bakımından dibenzofuran sınıfına ait özelliklere ve sarımsı bir renge sahiptir (Cocchietto ve ark. 2002; Ingolfssdottir 2002).

Ayrıca, uzun yıllardır geleneksel tedavide ve tıpta antimikrobiyal ajan olarak kullanımı mevcuttur (Guo ve ark. 2008).

Usnik asit [2,6-diasetil- 7,9-dihidroksi- 8,9b-dimetil-dibenzofuran- 1,3(2H,9bH)-dione] ilk kez 1844 yılında Alman bilim adamı Knop tarafından izole edilmiştir. Yapısal olarak (+) D-usnik ve (-) L-usnik asit olmak üzere 9b pozisyonundaki CH₃'ün durumuna göre 2 kısma ayrılmaktadır (Şekil 1.6.a.). Ayrıca, yapısal olarak usnik asite benzeyen (+) ve (-) izousnik asit [2,8-diasetil- 7,9-dihidroksi- 6,9b-dimeildibenzofuran- 1,3(2H,9bH)-dione] bileşiklerinin de likenlerde varlığı tespit edilmiştir (Şekil 1.6.b), (Cocchietto ve ark. 2002; Ingolfssdottir 2002; Koparal ve ark. 2006; Guo ve ark. 2008).

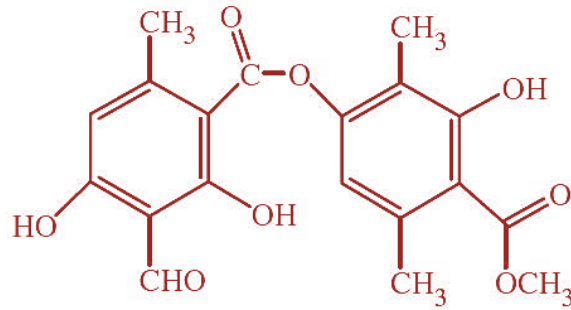


Şekil 1.6. Usnik (a) ve izousnik (b) asit metabolitlerinin kimyasal yapıları (Guo ve ark. 2008)

Usnik asidin biyolojik aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda; antimikrobiyal, antiprotozoal, antiproliferatif, anti-inflammatör, antipiretik, analjezik, insektisidal, larvasidal, beslenmeyi engelleyici, antitümoral, sitotoksik, fotoprotektif, hepatotoksik, enzim inhibe edici ve bazı vakalarda alerjik etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Lauterwein ve ark. 1995; Cocchietto ve ark. 2002; Ingolfssdottir 2002; Ribeiro-Costa ve ark. 2004; Behera ve ark. 2006; Koparal ve ark. 2006; Nybakken ve Julkunen-Tiitto 2006; Guo ve ark. 2008; Safak ve ark. 2009).

1.3.2. Atranorin

Likenlerden izole edilen sekonder metabolitler arasında sık rastlanan bir asit olan atranorin; 192-194 °C'de eriyen, renksiz, kokusuz, kristal yapıda bir liken metabolitidir ve usnarın, parmelin gibi farklı isimlerle de anılabilmektedir. Atranorin [3-formil-2,4-dihidroksi-6-metil-3-hidroksi-4-(metoksikarbonil)-2,5-dimetilfenil ester] kimyasal olarak depside grubunun önemli bir üyesidir (Şekil 1.7.) (Kumar ve Müller 1999; Podterob 2008; Valarmathi ve ark. 2009; Bačkorová ve ark. 2012).



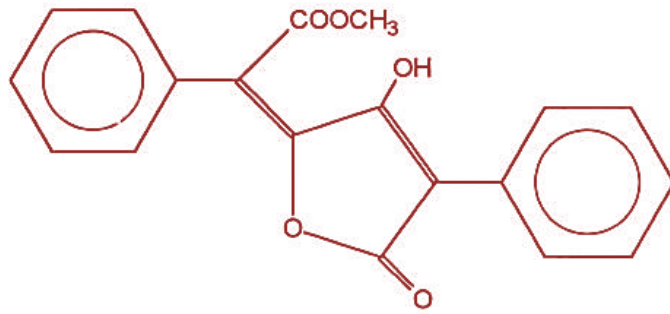
Şekil 1.7. Atranorin metabolitinin kimyasal yapısı (Cetin ve ark. 2012)

Atranorin üzerine yapılan çalışmalar sonucunda; UV-A ışınlarının likenlerde atranorin miktarını arttırdığı tespit edilmiş ancak; krom, fosfor, sülfür içerikli bileşikler sentezleyen bitkilerin yakınında gelişen likenlerde atranorin miktarının azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, bu metabolitin UV-A ve UV-B ışınlarını absorbe edebildiği belirlenmiştir (Rozema ve ark. 2002; Solhaug ve ark. 2003; Molnár ve Farkas 2010; Kováčik ve ark. 2011).

Atranorin, birçok liken türünde bulunan ve fotosenteze dahil olabilen bir metabolit olmakla birlikte antioksidan, antimikrobiyal, larvasidal ve enzim baskılayıcı bir liken asitidir, insanlar üzerinde ise dermatit etkeni olabilmektedir (Aalto-Korte ve ark. 2005; Boustie ve Grube 2005; Türk ve ark. 2006; Podterob 2008; Molnár ve Farkas 2010; Kováčik ve ark. 2011; Melo ve ark. 2011; Bačkorová ve ark. 2012; Cetin ve ark. 2012;).

1.3.3. Vulpinik asit

İlk kez 1925 yılında Mazza tarafından izole edilen vulpinik asit [Metil (2*E*)-2-(5-hidroksi-3-okso-4-fenilfuran-2-ilidene)-2-fenilasetat] bazı likenler ve likenize olmayan mantarlar tarafından şikimik asit yolağı ile sentezlenmektedir. Ayrıca, kimyasal olarak tetronate yapıda ve pulvinik asitin metil esteri durumunda sarımsı bir metabolittir (Şekil 1.8.) (Mazza 1925; Stocker-Wörgötter 2008; Burlando ve ark. 2009; Hauck ve ark. 2009; Kováčik ve ark. 2011).



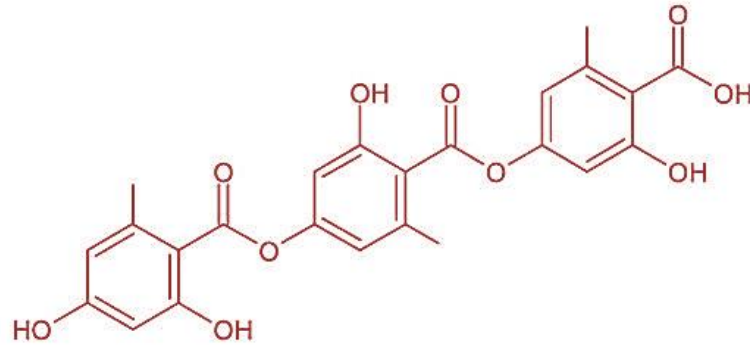
Şekil 1.8. Vulpinik asit metabolitinin kimyasal yapısı (Lauterwein ve ark. 1995)

Vulpinik asit üzerine yapılan çalışmalar sonucunda; antimikrobiyal, sitotoksik, yara iyileştirici, antitümoral, larvasidal ve beslenmeyi engelleyici etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, UV ışınlarına maruz bırakılan likenlerde vulpinik asit miktarında artış gözlemlenmiş ve UV ışınlarını absorblama özelliğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Lauterwein ve ark. 1995; Burlando ve ark. 2009; Molnár ve Farkas 2010; Kováčik ve ark. 2011; Cetin ve ark. 2012).

1.3.4. Giroforik asit

Kimyasal olarak tridepside grubuna dahil olan giroforik asit [4-[4-(2,4-dihidroksi -6- metilbenzoil) oksi -2- hidroksi -6- metilbenzoil] oksi -2- hidroksi -6- metilbenzoik asit] nispeten az çalışılmış liken asitlerindendir.

Ayrıca, giroforik asit 270-304 nm dalga boyu aralığındaki UV ışınlarını absorbe edebilme kapasitesine sahiptir (Şekil 1.9.), (Fahselt 1993; Candan ve ark. 2006; Bačkorová ve ark. 2011).



Şekil 1.9. Giroforik asit metabolitinin kimyasal yapısı (Bačkorová ve ark. 2011)

Giroforik asit üzerine yapılan çalışmalarda; antiproliferatif, antiherbivor, sitotoksik, antimikrobiyal, yara iyileştirici ve reaktif oksijen türlerini süpürücü etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir (Kumar ve Müller 1999; Candan ve ark. 2006; Burlando ve ark. 2009; Molnár ve Farkas 2010; Bačkorová ve ark. 2012).

1.4. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

1.4.1. HaCaT hücre hattı

İnsan deri keratinosit hücre hattı olan HaCaT hücreleri; insandan izole edilmiş ve sürekli çoğalabilme özelliğine sahip olan ilk epidermal hücre hattıdır. Anöloid karyotipe sahip olan HaCaT hücreleri; Boukamp ve arkadaşları tarafından ilk kez 1988 yılında Kafkas ırkına mensup 62 yaşında ki bir erkeğin derisinden izole edilmiş monolayer bir hücre hattıdır (Boukamp ve ark. 1997). HaCaT hücreleri, UV ışınlarının insan üzerine oluşturabileceği etkileri incelemede ve UV ışınlarına karşı koruyucu olduğu düşünülen ajanların test edilmesinde uygun bir model oluşturarak *in vitro* çalışmalara olanak sağlamaktadır (Engel ve ark. 2007; Poquet ve ark. 2008; Bae ve ark. 2010).

1.5. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

1.5.1. Hücrelerin UV-B ışınlarına maruz bırakılması

Likenlerden elde edilen sekonder metabolitlerin ve liken özütlerinin UV ışınlarına karşı koruyucu etkileri her geçen gün araştırmacıların daha çok dikkatini çekmekte ve bu konuda yapılan çalışmaların sayısı günden güne artmaktadır (Fahselt 1993; Rancan ve ark. 2002; Solhaug ve ark. 2003; Nybakken ve Julkunen-Tiitto 2006; Hager ve ark. 2008; Russo ve ark. 2008; Kohlhardt-Floehr ve ark. 2010; Kováčik ve ark. 2011). Ayrıca, UV ışınlarından dolayı her geçen gün artan deri kanseri vakaları ve UV ışınlarının yaşlandırıcı etkileri, bu tür çalışmalara olan ihtiyacı arttırmakta ve bu tür çalışmaları daha önemli bir hale getirmektedir (Narayanan ve ark. 2010; Seit   ve ark. 2010). Dolayısıyla, UV ışınlarına karşı koruyucu etkiye sahip olduğu düşün  len etken bileşiklerin pratikte böyle bir aktiviteye sahip olup olmadıklarının kesin bir yöntemle tespit edilmesi amacıyla yeni deney yöntemleri oluşturulmaktadır (Poquet ve ark. 2008; Kohlhardt-Floehr ve ark. 2010).

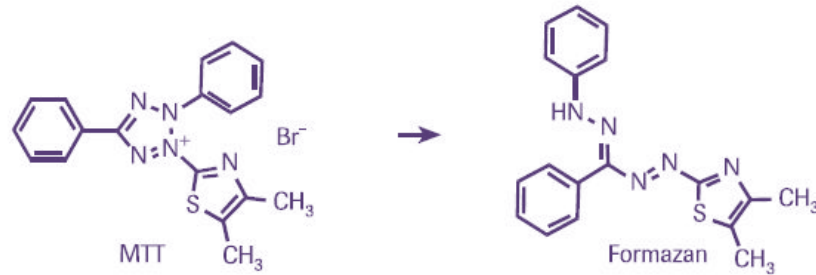
Poquet ve arkadaşları 2008 yılında; UV ışınlarına karşı dihidrokaffeik asidin koruyucu etkisini belirlemek amacıyla farklı bir deney yöntemi oluşturmuşlar ve bu çalışmada HaCaT hücrelerini kullanılmışlardır. Bu hücrelere koruyucu etken madde olarak dihidrokaffeik asit; UV öncesi, UV sonrası ve UV ile birlikte ayrı ayrı verilerek test edilmiştir. Kohlhardt-Floehr ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan deneylerde ise usnik asit metabolitinin, UV-B ışınlarına karşı koruyucu etkilerinin belirlenmesi amacıyla Jurkat hücreleri kullanılmış ve usnik asit bileşiğı, hücrelerin farklı dozlarda UV-B ışınlarına maruz bırakılmasını takiben uygulanmıştır.

HaCaT hücreleri yapılan deneysel çalışmalar; 2,5 J/cm²'lik UV-B dozunun HaCaT hücreleri için IC₅₀ değeri olduğunu göstermiştir (Offord ve ark. 2002; Tarozzi ve ark. 2005; Zanatta ve ark. 2010). Ayrıca; UV ışınlarının hücre medyumunda içindeki fenol-red boyası (pH indikat  r  ) ve fetal bovine serum (FBS) tarafından absorbe edildiğı tespit edilmiştir.

Bu nedenle, UV ışınlarına maruz bırakılma süresince hücre medyumuna yerine PBS (Phosphate Buffer Saline) kullanımının daha uygun olduğu belirlenmiştir (Hernandez-Pigeon ve ark. 2006; Engel ve ark. 2007; Poquet ve ark. 2008; Gläser ve ark. 2009; Choi ve ark. 2010; Zanatta ve ark. 2010).

1.5.2. Mitokondrial aktiviteye dayalı MTT testi

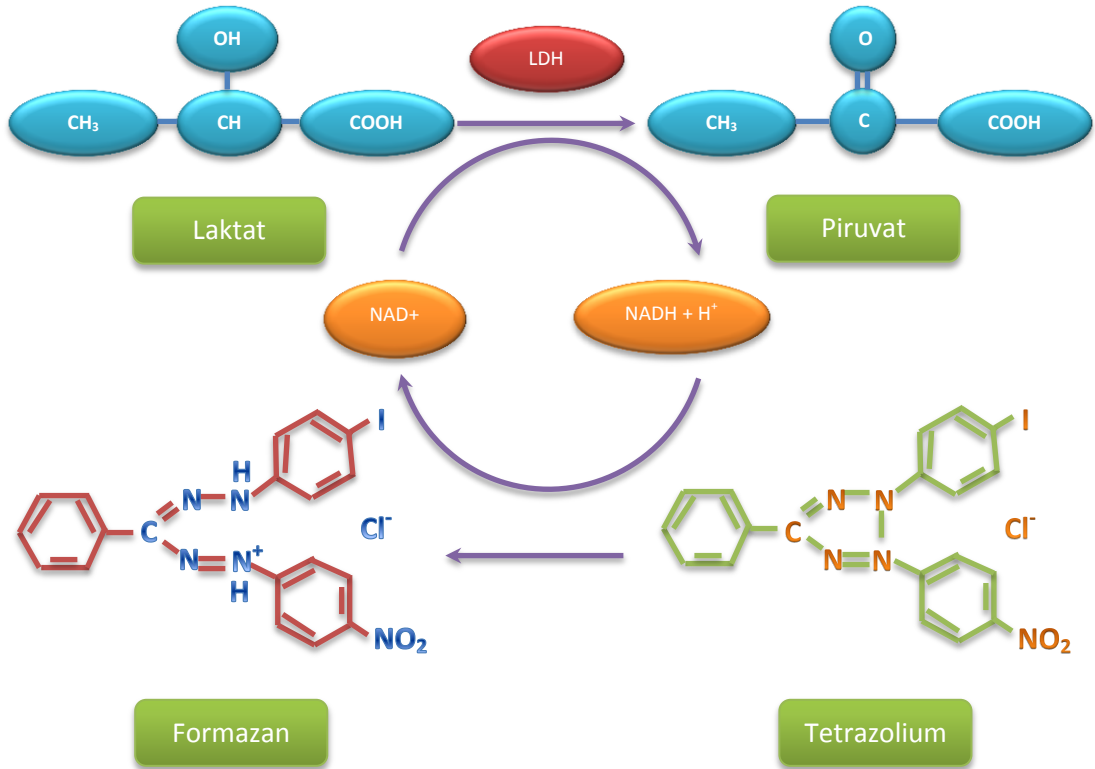
Basit ve güvenilir bir yöntem olması nedeniyle *in vitro* çalışmalarda çok tercih edilen MTT [3-(4,5- dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide] testi, suda çözünmeyen sarı renkli tetrazolium tuzlarının, suda çözünemeyen mor renkli formazan tuzlarına indirgenmesi temeline dayanmaktadır (Şekil 1.10.). Sitotoksikite testleri sonucunda yaşayan hücrelerin belirlenmesi amacıyla hücrelerin, MTT boyası içeren hücre medyumunda inkübasyonu ile uygulanır (Mossmann 1983; Yuanbin Liu ve ark. 1997; Risuleo ve ark. 2009; Iqbal ve ark. 2010; Wang ve ark. 2010). Hücre medyumunda çözünmüş olan tetrazolium tuzları, yaşayan hücreler tarafından endositoz yoluyla hücre içine alınırlar ve mitokondrilerin elektron taşıma sistemlerinin (ETS) elemanları olan primidin nükleotid kofaktör NADH, NADPH dehidrojenazlar ve N-etilmaleimide (NEM) duyarlı flavin oksidazlar aracılığıyla formazan tuzlarına indirgenirler (Şekil 1.10), (Yuanbin Liu ve ark. 1997; Wang ve ark. 2010). Suda çözünmeyen mor renkli formazan tuzları, dimetilsülfoksit (DMSO) gibi organik çözücüler içinde çözünmekte ve 570 nm’de absorbanslarının ölçülmesiyle yaşayan hücre miktarları spektral olarak belirlenebilmektedir (Mossmann 1983; Yuanbin Liu ve ark. 1997; Hamid ve ark. 2004; Jaszczyszyn ve Gasiowski 2008; Wu ve ark. 2008; Risuleo ve ark. 2009; Iqbal ve ark. 2010; Wang ve ark. 2010).



Şekil 1.10. Canlı hücreler tarafından MTT’nin formazan tuzuna metabolizasyonu

1.5.3. Laktat dehidrojenaz (LDH) aktivite ölçümü

Laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesinin ölçülmesi canlı ve sağlıklı hücrelerin belirlenmesinden ziyade ölmüş veya hücre zarı zarar görmüş hücrelerin miktarının ölçülmesi temeline dayanmaktadır. LDH tüm hücrelerde stabil olarak bulunan, ancak bir hücrenin ölümü veya plazma zarının zarar görmesi sonucu hücre medyumuna bırakılan sitoplazmik bir enzimdir. Hücre medyumuna bırakılan LDH hücre içinde olduğu gibi aktivitesini devam ettirmektedir (Fotakis ve Timbrell 2006; Smith ve ark. 2011; Manerba ve ark. 2012). Bu nedenle, hücrelerden izole edilen medyuma, laktat ve sarı renkli tetrazolium tuzlarıyla (2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenil]-5-feniltetrazolium klorit) oluşturulan karışım, reaksiyon solüsyonu olarak eklenir.



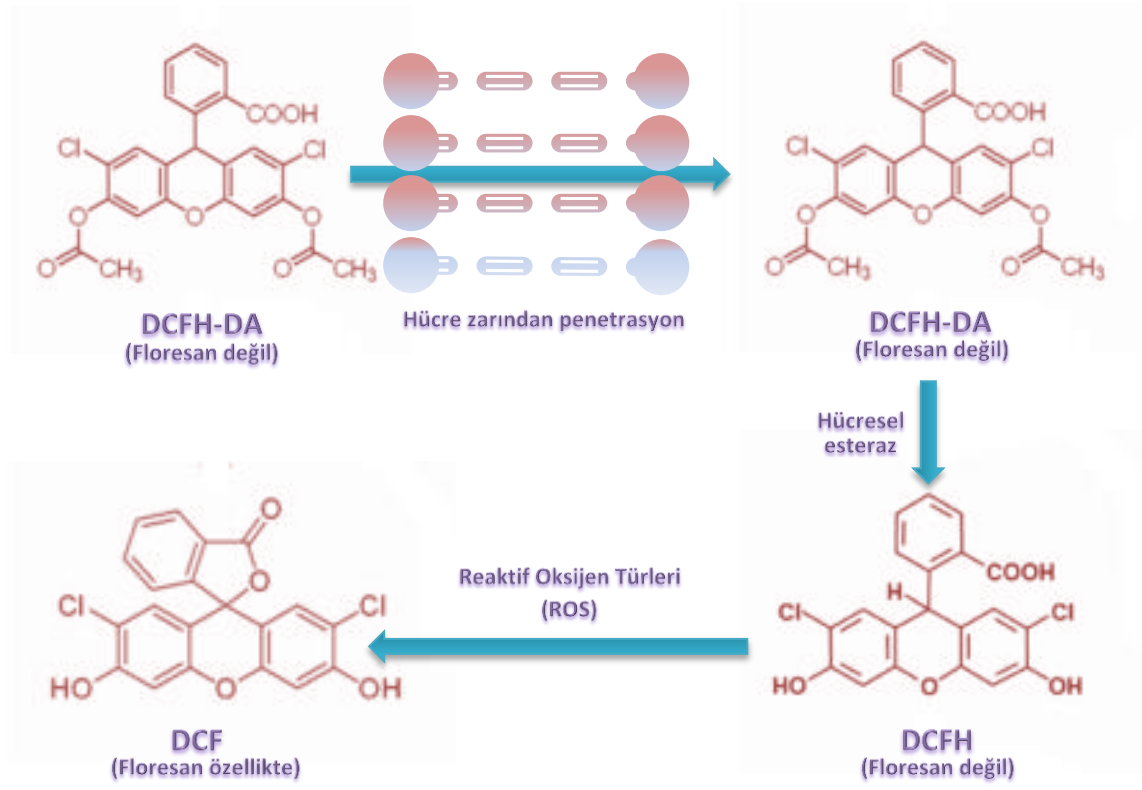
Şekil 1.11. Laktat dehidrojenaz (LDH) aktivite testi reaksiyon diyagramı (Fotakis ve Timbrell 2006)

Hücreler tarafından medyum ortamına bırakılmış LDH enzimleri, laktat bileşiğini piruvat bileşiğine katalizler ve ortamda bulunan NAD⁺ bileşiklerini NADH/H⁺ olarak dönüştürür. NADH/H⁺ ürünleri ise sarı renkli tetrazolium tuzlarının, kırmızı renkli formazan tuzlarına indirgenmesini sağlamaktadır (Şekil 1.11.). Suda çözünebilen kırmızı renkli formazan tuzlarının 490-500 nm’de absorbanlarının ölçülmesiyle LDH miktarı spektral olarak belirlenebilmekte, böylece ölen ya da hücre zarı hasar gören hücrelerin miktarı dolaylı olarak hesaplanabilmektedir (Fotakis ve Timbrell 2006; Le ve ark. 2010; Smith ve ark. 2011; Zhang ve ark. 2011; Manerba ve ark. 2012).

1.5.4. Reaktif oksijen türleri (ROS) birikiminin ölçümü

Ultraviyole ışınların, deri hücrelerinde reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırdığı önceden yapılmış çalışmalarda gösterilmiş ve reaktif oksijen türlerinin, mitojen aktiflenmiş protein kinaz (MAPK) sinyal yolağında bir etken olarak deri kanseri, yaşlanma, iltihaplanma gibi oluşumları tetiklediği belirlenmiştir (Şekil 1.5.), (Bae ve ark. 2010; Choi ve ark. 2010). Ayrıca, reaktif oksijen türlerinin nükleik asit, protein ve lipid gibi biyomoleküllerde oksidatif hasar oluşturduğu bilinmektedir (Koç ve Üstün 2008; Molnár ve Farkas 2010; Tsuda 2012). Dolayısıyla UV ışınlarla karşı koruyucu olduğu düşünülen etken maddelerin aynı zamanda antioksidan özellikte olması beklenmektedir (Russo ve ark. 2008; Choi ve ark. 2010; Swalwell ve ark. 2012).

Hücre kültüründe yapılan ROS birikimi ölçümü deneylerinde floresan özellikte olmayan ve hücre içine difüze olabilen DCFH-DA [2',7'-Diklorodihidrofloresin diasetat] molekülü belirteç olarak kullanılmaktadır. Hücre içine giren DCFH-DA molekülleri diasetat grubunu kaybederek yine floresan özellikte olmayan DCFH [2',7'-Diklorodihidrofloresin] moleküllerine dönüşmektedir. DCFH molekülleri ise hücre içinde birikmiş olan reaktif oksijen türleri tarafından aktive edilerek floresan ışımaya gösterebilen, 480 nm ışık tarafından uyarılarak 530 nm ışımaya gösteren DCF [2',7'-Diklorodihidrofloresin] moleküllerine dönüşmektedir (Şekil 1.12.).



Şekil 1.12. Hücre içi ROS birikiminin DCF metabolizması ile ilişkisi (Russo ve ark. 2008)

Böylece, hücre içinde biriken ROS miktarı spektral olarak belirlenebilmektedir (Russo ve ark. 2008; Iovine ve ark. 2009; Pauloin ve ark. 2009). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; usnik asit, atranorin ve giroforik asit metabolitleri UV-B ışınlarının hücreler üzerine oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin birikimine karşı antioksidan aktiviteye sahiptir (Kohlhardt-Floehr ve ark. 2010; Molnár ve Farkas 2010; Bačkorová ve ark. 2012; Buçukoglu ve ark. 2012). Vulpinik asit metabolitinin ise reaktif oksijen türleri (ROS) birikimine karşı aktivitesi hakkında herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

1.5.5. TRITC-phalloidin boyama

Aktin filamentleri; hücre iskeletinin yapısında yer alan, hücre bölünmesinde, hücre göçünde, sekresyonda, hücreler arası iletişimde, endositoz ve ekzositoz gibi önemli hücre faaliyetlerde görevli bir komponenttir.

Aktin filamentleri, hücre siklusunun S fazının sonunda kontraktıl kofulda yoğunlaştığı halde, G0/G1 fazında hücre iskeletinin önemli bileşiklerinden olan stres ipliklerine yardımcı olmaktadır (Fujiwara ve ark. 2004).

Zehirli *Amanita phalloides* mantarından izole edilen fungal bir toksin olan phalloidin, f-aktinlere bağlanma eğilimindedir. Floresan ışığı ise phalloidin toksinine bağlanmış olan TRITC molekülü sağlamaktadır. UV-B ışınlarının ise f-aktinlerin yapısını bozarak hücre bölünmesinde ve karyokinezde hatalara neden olduğu bulunmuştur (Chen ve ark. 2011).

1.5.6. DAPI [4,6-diamidino-2-fenilindole, dihidroklorit] boyama

DNA'ya bağlanabilen floresan bir boya olan DAPI, adenin-timin (AT) kümeleri arasındaki küçük boşluklara dolarak aktive olurlar. Hücre çekirdeğinde meydana gelen morfolojik değişimler, 358-461 nm dalga boyunda ışığı gösteren DAPI boyama sonucunda belirlenebilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda; UV-B ışınlarının nükleik asitlerin yapılarında bozulmalara neden olarak çekirdek morfolojisini değiştirdiği belirlenmiştir (Xiong 2001; Yu-Ying He ve Häder 2002; Kumar ve ark. 2004; Xia ve ark. 2004; Chen ve ark. 2007; Wang ve ark. 2008; Chen ve ark. 2012).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Liken Asitlerinin İzolasyon Yöntemleri

2.1.1. (-) - Usnik asit bileşiğinin izolasyonu

Usnik asit bileşiği *Cladonia foliacea* likeninden izole edilmiştir. Eskişehir Mayıslar köyünün doğu mevkiinde 230 metre yükseklikten Doç.Dr. Mehmet Candan tarafından toplanan ve tayin edilen *C. foliacea* türü likenler Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda (ANES) örnek olarak saklanmıştır. Çalışmada kullanılacak likenler ise havada kurutma yöntemi ile kurutulmuş ve izolasyon işlemleri Doç.Dr. Turgay Tay tarafından yapılmıştır.

Kurutulmuş likenlerden 20 gr tartılarak 100 ml asetonda çözülmüş ve karışım bir saat sonikasyona tabi tutulmuştur. Bir gece oda sıcaklığında bekletilen karışım Whatman No 1 kağıdı ile filtre edilmiştir. Filtre edilen solüsyon 0,45 µm filtre ile sterilize edilmiş ve çözücü solüsyon rotavapor ile uçurulmuştur. Elde edilen özüt ince tabaka kromatografisi (TLC) ile ayrılarak (-)– usnik asit izolasyonu sağlanmıştır (Yılmaz ve ark. 2004).

2.1.2. Atranorin bileşiğinin izolasyonu

Atranorin bileşiği *Pseudevernia furfuracea* likeninden izole edilmiştir. Eskişehir Bozdağ mevkiinde 1200 metre yükseklikten *Pinus nigra subsp. pallasiana* türünün gövdeleri üzerinden Doç.Dr. Mehmet Candan tarafından toplanan ve tayin edilen *P. furfuracea* türü likenler Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda (ANES) örnek olarak saklanmıştır. Çalışmada kullanılacak likenler ise havada kurutma yöntemi ile kurutulmuş ve izolasyon işlemleri Doç.Dr. Turgay Tay tarafından yapılmıştır. Kurutulmuş likenlerden 20 gr tartılarak 100 ml asetonda çözülmüş ve karışım bir saat sonikasyona tabi tutulmuştur. Bir gece oda sıcaklığında bekletilen karışım Whatman No 1 kağıdı ile filtre edilmiştir. Filtre edilen solüsyon 0,45 µm filtre ile sterilize edilmiş ve çözücü solüsyon rotavapor ile uçurulmuştur. Elde edilen özüt ince tabaka kromatografisi (TLC) ile ayrılarak atranorin bileşiğinin izolasyonu sağlanmıştır (Türk ve ark. 2006).

2.1.3. Vulpinik asit bileşiminin izolasyonu

Vulpinik asit bileşimi *Letharia vulpina* (L.) hue likeninden izole edilmiştir. Eskişehir Kavacık köyünün kuzey mevkiinde 1085 metre yükseklikten *Pinus nigra* türü bitki üzerinden Doç.Dr. Mehmet Candan tarafından toplanan ve tayin edilen *L. vulpina* türü likenler Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda (ANES) örnek olarak saklanmıştır. Çalışmada kullanılacak likenler ise havada kurutma yöntemi ile kurutulmuş ve izolasyon işlemleri Doç.Dr. Turgay Tay tarafından yapılmıştır. Kurutulmuş likenlerden 20 gr tartılarak 100 ml asetonda çözülmüş ve karışım bir saat sonikasyona tabi tutulmuştur. Bir gece oda sıcaklığında bekletilen karışım Whatman No 1 kağıdı ile filtre edilmiştir.

Filtre edilen solüsyon 0,45 µm filtre ile sterilize edilmiş ve çözücü solüsyon rotavapor ile uçurulmuştur. Elde edilen özüt ince tabaka kromatografisi (TLC) ile ayrılarak vulpinik asit bileşiminin izolasyonu sağlanmıştır.

2.1.4. Giroforik asit bileşiminin izolasyonu

Giroforik asit bileşimi *Xanthoparmelia pokornyi* likeninden izole edilmiştir. Eskişehir Bozdağ mevki 1200 metre yükseklikten Doç.Dr. Mehmet Candan tarafından toplanan ve tayin edilen *X. pokornyi* türü likenler Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü Herbaryumunda (ANES) örnek olarak saklanmıştır. Çalışmada kullanılacak likenler ise havada kurutma yöntemi ile kurutulmuş ve izolasyon işlemleri Doç.Dr. Turgay Tay tarafından yapılmıştır. Kurutulmuş likenlerden 20 gr tartılarak 100 ml asetonda çözülmüş ve karışım bir saat sonikasyona tabi tutulmuştur. Bir gece oda sıcaklığında bekletilen karışım Whatman No 1 kağıdı ile filtre edilmiştir. Filtre edilen solüsyon 0,45 µm filtre ile sterilize edilmiş ve çözücü solüsyon rotavapor ile uçurulmuştur. Elde edilen özüt ince tabaka kromatografisi (TLC) ile ayrılarak giroforik asit bileşiminin izolasyonu sağlanmıştır (Candan ve ark. 2006) .

2.2. Kullanılan Araç ve Gereçlerin Hazırlanması

Çalışmalarda kullanılan bazı cam ve plastik malzemeler ile sıvı solüsyonlar alüminyum folyolara sarılı olarak otoklavda 121 °C ve 1,5 atm/Hg basınçta 20 dakika, diğer cam ve metal malzemeler ise alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180 °C'de 2 saat süre ile steril edilerek kullanılmıştır. Kullanılan bazı sıvı kimyasallar 0,2 µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirmek suretiyle steril edilerek kullanılmıştır.

2.3. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

Bütün test maddeleri; dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek stok solüsyon hazırlanmış ve 25 – 50 – 100 – 200 – 400 - 800 µM'lık konsantrasyonlar PBS (Phosphate Buffer Saline: 137 µM NaCl, 2.7 µM KCl, 15 µM KH₂PO₄, 8 µM NaHPO₄; pH 7.3) içinde hazırlanmıştır.

Test maddeleri, DMSO içinde çözüldüğü için; negatif kontrol olarak çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır. DMSO'in final konsantrasyonu % 0,3 den küçük olacak şekilde ayarlanmıştır. Stok çalışma solüsyonu her çalışma için yeniden hazırlanarak kullanılmıştır.

2.4. Çalışmada Kullanılan Hücreler

2.4.1. HaCaT hücre kültürü

HaCaT (Human keratinocyte cell line) hücreleri ATCC (American Type Culture Collection)'dan satın alınıp stoklanmış hücrelerdir. Hücreler; %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve 1,5 g/L sodyum bikarbonat içeren Dubecco's Modified Eagles – High Glucose (DMEM yüksek glukoz) medyum içinde 37°C ve % 5 CO₂ ortamında kültüre edilmişlerdir.

2.5. Hücrelerin Testler İçin Hazırlanması

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Trypan blue boyası ile boyanan hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak belirlenen sayıda hücreler %10 FBS içeren DMEM yüksek glukoz besi yeri içinde, hücre kültürü plakalarına, hücre süspansiyonu halinde, aktarılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yeni ortama alışması için 37°C'de inkübe edilmişlerdir. Belirlenen inkübasyon süreleri sonunda hücrelerin üzerindeki besi yerleri uzaklaştırılmış ve deney yöntemleri uygulanmıştır.

2.5.1. Genel deney yöntemi

2.5.1.1. Doksan altı kuyucuklu plakalarda uygulanan yöntem

HaCaT hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* deneylerde, test maddelerinin UV-B ışınlarına karşı koruyucu etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu kapsamda, her bir test bileşiği için ayrı olmak üzere, 96'lık plakalara 2×10^4 hücre/kuyucuk oranında hücrelerin ekilmesiyle, 48 saat inkübasyona bırakılan 2 adet 96 kuyucuklu plaka kullanılmıştır. İnkübasyona bırakılan plakalardan biri, UV-B ışınlarına maruz bırakılırken diğer plaka, UV-B ışınlarına maruz bırakılmadan birincinin maruz kaldığı tüm diğer koşullara sahip olarak kontrol plakası görevi görmüştür. Plakaların UV-B ışınına maruz bırakılma işlemi, UVP marka C-65 chromato-vue kabin içerisinde, üç farklı dalga boyu seçeneğine sahip olan (254-302-365 nm) UVP marka EL-serisi 8 watt lamba aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. UV-B dozu ise UVP marka UVX radyometre ile mW/cm^2 cinsinden ölçülerek " $\text{J/cm}^2 = t(\text{sn}) \times 10^{-3} \times \text{mW/cm}^2$ " formülüyle hesaplanmıştır.

Test bileşiklerinin farklı etkilerini belirlemek amacıyla uygulanan deneyler için genel yöntem aşağıdaki gibidir;

- 1- 96 kuyucuklu plakalara 2×10^4 hücre/kuyucuk olarak ekilen hücreler 48 saat inkübasyona bırakılır.

- 2- İnkübasyon süresi sonunda plakalar ters çevrilerek hücre medyumunu uzaklaştırılır ve yerine test bileşiklerinin belirlenen konsantrasyonlarını içeren PBS verilir.
- 3- Plakalar test bileşiklerinin hücreler ile etkileşime girmesi ve çeşitli biyolojik faaliyetlerin gerçekleşmesi amacıyla 40 dakika inkübasyona bırakılır.
- 4- İnkübatörden çıkarılan plakalardan biri $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına 40 dakika süreyle maruz bırakılırken, diğer plaka bu süre zarfında inkübatör dışında bekletilir.
- 5- Plakalar tekrar inkübatör içine alınarak 40 dakika inkübasyona bırakılır ve biyolojik faaliyetlerin gerçekleşmesi beklenir.

2.5.1.2. On iki kuyucuklu plakalarda uygulanan yöntem

HaCaT hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* deneylerde, test maddelerinin UV-B ışınlarına karşı koruyucu etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu kapsamda, her bir test bileşiği için ayrı olmak üzere, 12'lik plakalara yuvarlak lameller yerleştirilmesi ve kuyucuklara 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmasını takiben 24 saat inkübasyona bırakılan, 2 adet 12 kuyucuklu plaka kullanılmıştır. Bu plakalardan biri UV-B ışınlarına maruz bırakılırken diğer plaka UV-B ışınlarına maruz bırakılmadan birincinin maruz kaldığı tüm diğer koşullara sahip olarak kontrol plakası görevi görmüştür. Plakaların UV-B ışınına maruz bırakılma işlemi, UVP marka C-65 chromato-vue kabin içerisinde, üç farklı dalga boyu seçeneğine sahip olan (254-302-365 nm) UVP marka EL-serisi 8 watt lamba aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. UV-B dozu ise UVP marka UVX radyometre ile mW/cm^2 cinsinden ölçülerek " $\text{J/cm}^2 = t(\text{sn}) \times 10^{-3} \times \text{mW/cm}^2$ " formülüyle hesaplanmıştır.

Test bileşiklerinin farklı etkilerini belirlemek amacıyla uygulanan deneyler için genel yöntem aşağıdaki gibidir;

- 1- 12 kuyucuklu plakalara 2×10^5 hücre/kuyucuk olarak ekilen hücreler 24 saat inkübasyona bırakılır.
- 2- İnkübasyon süresi sonunda plakalardan hücre medyumunu uzaklaştırılır ve yerine test bileşiklerinin belirlenen konsantrasyonlarını içeren PBS verilir.
- 3- Plakalar test bileşiklerinin hücreler ile etkileşime girmesi ve çeşitli biyolojik faaliyetlerin gerçekleşmesi amacıyla 40 dakika inkübasyona bırakılır.
- 4- İnkübatörden çıkarılan plakalardan biri $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına 40 dakika süreyle maruz bırakılırken, diğer plaka da bu süre zarfında inkübatör dışında bekletilir.
- 5- Plakalar tekrar inkübatör içine alınarak 40 dakika inkübasyona bırakılır ve biyolojik faaliyetlerin gerçekleşmesi beklenir.

2.5.3. MTT ölçümü (*in vitro* hücre canlılığı belirleme çalışmaları)

Madde 2.5.1.1'de belirtilen genel yönteme tabi tutulan hücrelerden uygulama süresi sonunda, PBS uzaklaştırılmış ve yerine medyum ilave edilerek 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücre medyumunu uzaklaştırılmıştır. Hücreler 5 mg/ml^{-1} MTT solüsyonu ile canlı hücrelerin mitokondrial metabolik aktiviteleri sonucu MTT boyasının suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüşebilmesi için 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılmıştır. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzlarının çözünmesi için her bir kuyucuğa 0,1 ml DMSO ilave edilmiştir.

Plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri (OD) ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesiyle ve UV-B ışınları ile muamele

edilmeyen kontrol hücre canlılık oranı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir (Mossmann 1983). Deneyler, birbirinden bağımsız olarak 3 kez tekrarlanmıştır. MTT deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

2.5.4. LDH ölçümü

Laktat Dehidrojenaz Testi (LDH) bir protein deneyidir, hücreler tarafından kullanılan medyumdaki laktat dehidrojenaz ölçümüne dayanmaktadır. Güvenilirliği, hızı ve basit olması bu testin özellikleridir. Hücre içi LDH kaybı ve bunun medyum ortamına hücre tarafından bırakılması hücre zarında hasar meydana gelmesi ve buna bağlı olarak hücre ölümünün bir belirticidir. LDH testi Fotakis ve Timbrell (2006) metoduna göre uygulanmıştır.

Madde 2.5.1.1 de tarif edilen genel yönteme uygun olarak deney gerçekleştirilir ve uygulamayı takiben hücrelerden PBS uzaklaştırılarak yerine medyum ilave edilerek plakalar 4 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi sonunda deneyler Roche LDH kiti kullanılarak, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapılmıştır.

LDH deneylerinin sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS programı kullanılmış ve elde edilen verilerin tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak anlamlılıkları belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edilmiştir.

2.5.5. ROS ölçümü

Reaktif Oksijen Türleri testi (ROS testi) antioksidant özelliği veya ROS miktarını belirlemeye yarayan hücre temelli ve floresan özellikli bir deneydir. Madde 2.5.1.1'e uygun olarak gerçekleştirilen ve siyah dipli 96'lık plakaların kullanıldığı yöntem, OxiSelect TM Intracellular ROS Assay Kit (Gren Fluorescence) kullanılarak üretici firmanın direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

2.5.6. TRITC-phalloidin boyama yöntemi

On iki kuyucuklu plakalara yerleştirilen steril lameller üzerine 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen HaCaT hücreleri 24 saat süre ile lamellerin üzerine yapışmaları için 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Deney yöntemi madde 2.5.1.2'ye uygun olarak gerçekleştirilmiş ve bu süre sonunda lameller % 3.7'lik formaldehit ile tespit edilmişlerdir. Daha sonra steril fosfatlanmış tampon çözeltisi (PBS: $137 \mu\text{M}$ NaCl, $2.7 \mu\text{M}$ KCl, $15 \mu\text{M}$ KH_2PO_4 , $8 \mu\text{M}$ NaHPO_4 ; pH 7.3) ile yıkamaları yapılan lamellere, $5 \mu\text{g/ml}$ TRITC-phalloidin ile 60 dakika muamele yapılarak hücrelerin f-aktin komponentleri boyanmıştır. Daha sonra PBS ile yıkanan lameller ile preparatlar hazırlanarak floresan ataçmana sahip Olympus BX50 mikroskop ile incelenmişler ve 100x büyütme ile fotoğrafları çekilmiştir.

2.5.7. DAPI boyama yöntemi

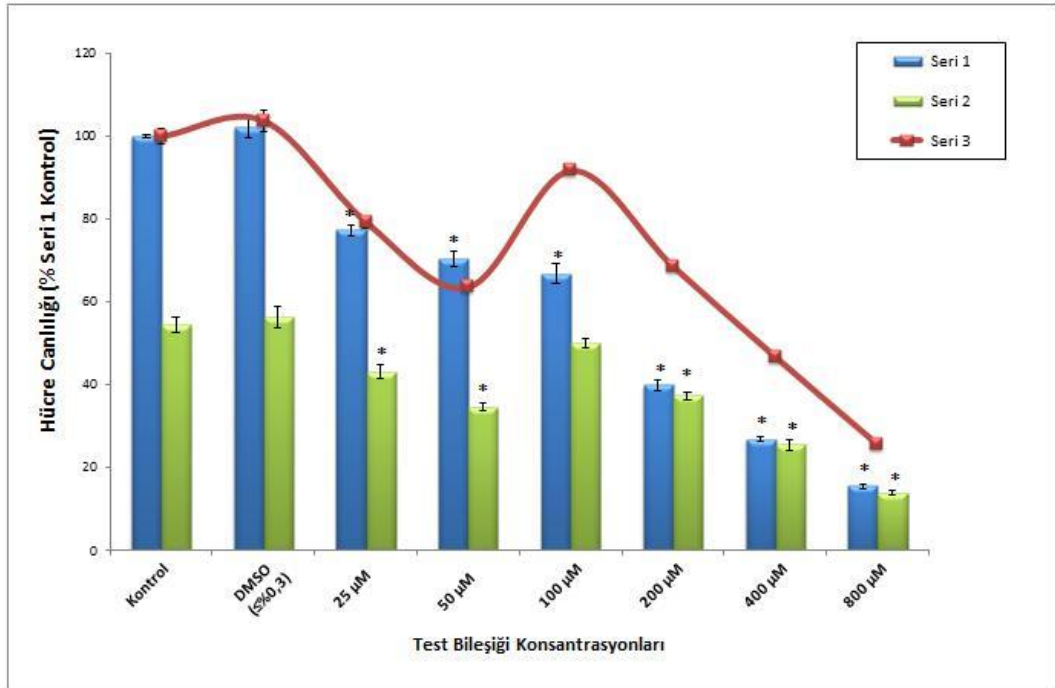
On iki kuyucuklu plakalara yerleştirilen steril lameller üzerine 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilen HaCaT hücreleri 24 saat süre ile lamellerin üzerine yapışmaları için 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörde kültüre edilmişlerdir. Deney yöntemi madde 2.5.1.2'ye uygun olarak gerçekleştirilmiş ve bu süre sonunda lameller %3,7'lik formaldehit ile tespit edilmişlerdir. Daha sonra steril fosfatlanmış tampon çözeltisi (PBS: $137 \mu\text{M}$ NaCl, $2.7 \mu\text{M}$ KCl, $15 \mu\text{M}$ KH_2PO_4 , $8 \mu\text{M}$ NaHPO_4 ; pH 7.3) ile yıkamaları yapılan lamellere, 1 mg/ml DAPI boya ile 30 dakika muamele yapılarak hücrelerin çekirdek materyalleri boyanmıştır. Daha sonra PBS ile yıkanan lameller ile preparatlar hazırlanarak floresan ataçmana sahip Olympus BX50 mikroskop ile incelenmişler ve 100x büyütme ile fotoğrafları uygun kontrast ve netlikte çekilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. MTT Sonuçları (Hücre Kültürü Yoluyla *In Vitro* Sitotoksite Belirleme Çalışmaları)

(-) - usnik asit, atranorin, vulpinik asit ve giroforik asit bileşiklerinin 25-50-100-200-400 ve 800 μM konsantrasyonları HaCaT hücreleri üzerine uygulanarak *in vitro* sitotoksik etkilerinin ve 2,5 J/cm^2 UV-B ışınına karşı koruyucu etkilerinin MTT testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

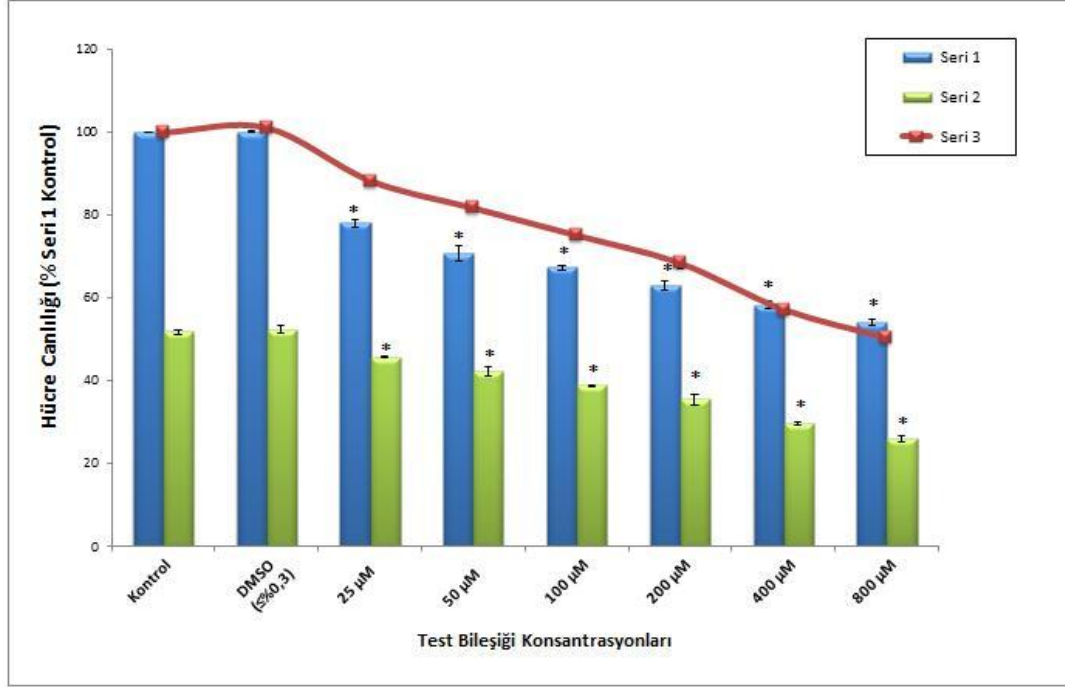
3.1.1. (-) - Usnik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri



Şekil 3.1. (-) - Usnik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. Seri 1: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik aktivitesi, Seri 2: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonları + 2,5 J/cm^2 UV-B ışınının sitotoksik aktivitesi, Seri 3: Seri 2'nin kendine ait kontrol grubuna göre değerlendirilmesi. (*) işareti UV-B ışınlarına ve maddeye maruz kalmamış kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

Usnik asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine olan UV-B ışınlarına karşı koruyucu ve HaCaT hücreleri üzerine sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan MTT testi sonucuna göre; usnik asit bileşimi yoğunluğa bağımlı olarak HaCaT hücreleri üzerine yüksek toksik etkilere sahiptir. Bununla birlikte; test bileşimi, uygulanan $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına karşı HaCaT hücreleri için koruyucu bir etkiden çok absorbe edici bir etkiye sahiptir. Uygulanan test yöntemindeki kontrol plakasında UV-B ışınlarına maruz bırakılmayan HaCaT hücrelerinde $100 \mu\text{M}$ 'lık test bileşimi uygulaması kontrolüne göre yaklaşık %30'luk bir sitotoksositeye sahipken, $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına maruz bırakılan HaCaT hücrelerinde $100 \mu\text{M}$ 'lık test bileşimi kontrolüne göre yaklaşık %10'luk bir sitotoksik etkinliğe sahiptir. Ayrıca, UV-B ışınına maruz bırakılan hücrelerde $50 \mu\text{M}$ 'lık konsantrasyon uygulaması kontrolüne göre %20'ye yakın bir sitotoksositeye sahipken $200 \mu\text{M}$ 'lık test bileşimi uygulaması kontrolüne göre %15'e yakın bir sitotoksositeye sahiptir. Bu sonuçlara göre; usnik asit bileşiminin HaCaT hücrelerini UV-B ışınlarına karşı tam olarak koruyamadığı ancak UV-B ışınlarıyla etkileşime girerek kendi sitotoksitesini azalttığı ve absorbe edebilme kapasitesine sahip olduğu söylenebilir.

3.1.2. Atranorin bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri

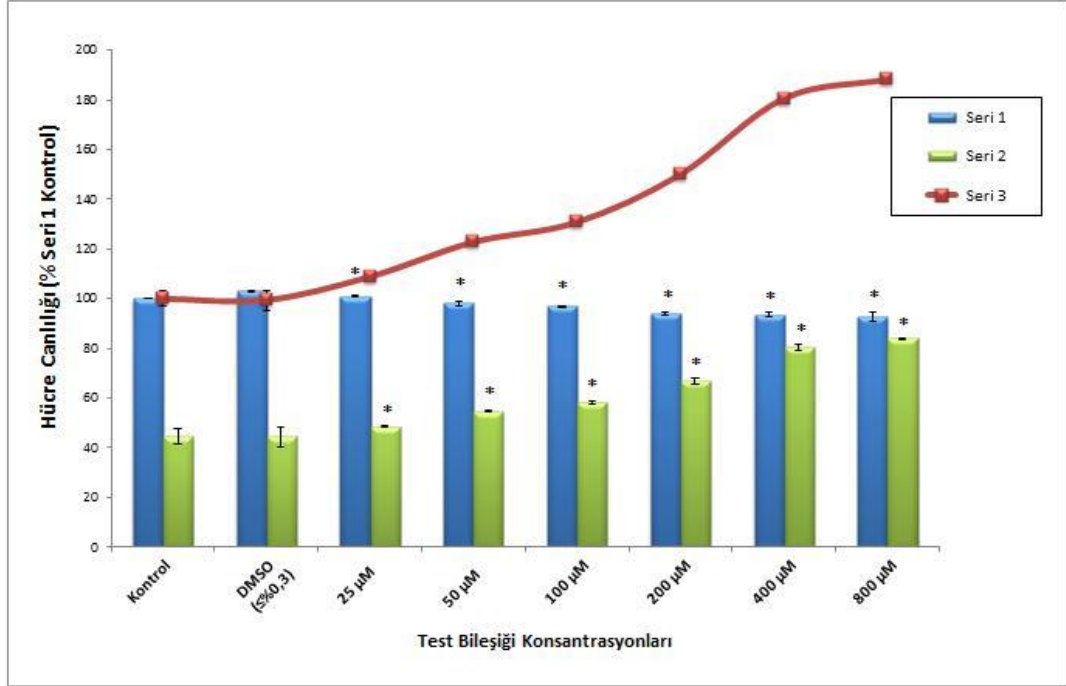


Şekil 3.2. Atranorin bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. Seri 1: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik aktivitesi, Seri 2: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonları + 2,5 J/cm² UV-B ışınının sitotoksik aktivitesi, Seri 3: Seri 2'nin kendine ait kontrol grubuna göre değerlendirilmesi. (*) işareti UV-B ışınlarına ve maddeye maruz kalmamış kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p < 0,05

Atranorin bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine olan UV-B ışınlarına karşı koruyucu ve HaCaT hücreleri üzerine sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan MTT testi sonucuna göre; atranorin bileşiği yoğunluğa bağımlı olarak HaCaT hücreleri üzerine toksik etkilere sahiptir. Bununla birlikte; test bileşiği uygulanan 2,5 J/cm² UV-B ışınına karşı HaCaT hücreleri için filtreleyici bir etki sergilemektedir. Uygulanan test yöntemindeki kontrol plakasında; UV-B ışınlarına maruz bırakılmayan HaCaT hücrelerinde 800 µM'lık yoğunluk kontrolüne göre %45'e yakın bir sitotoksositeye sahipken, 2,5 J/cm² UV-B ışınına maruz bırakılan HaCaT hücrelerinde 800 µM'lık konsantrasyon kontrolüne göre yaklaşık %25 oranında bir sitotoksik etkinliğe sahiptir.

Dolayısıyla; uygulanan deney yöntemine göre elde edilen veriler ışığında atranorin bileşiğinin HaCaT hücreleri için sitotoksik özellikte olduğunu ancak UV-B ışınlarını absorbe edebildiği savunulabilir.

3.1.3. Vulpinik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri

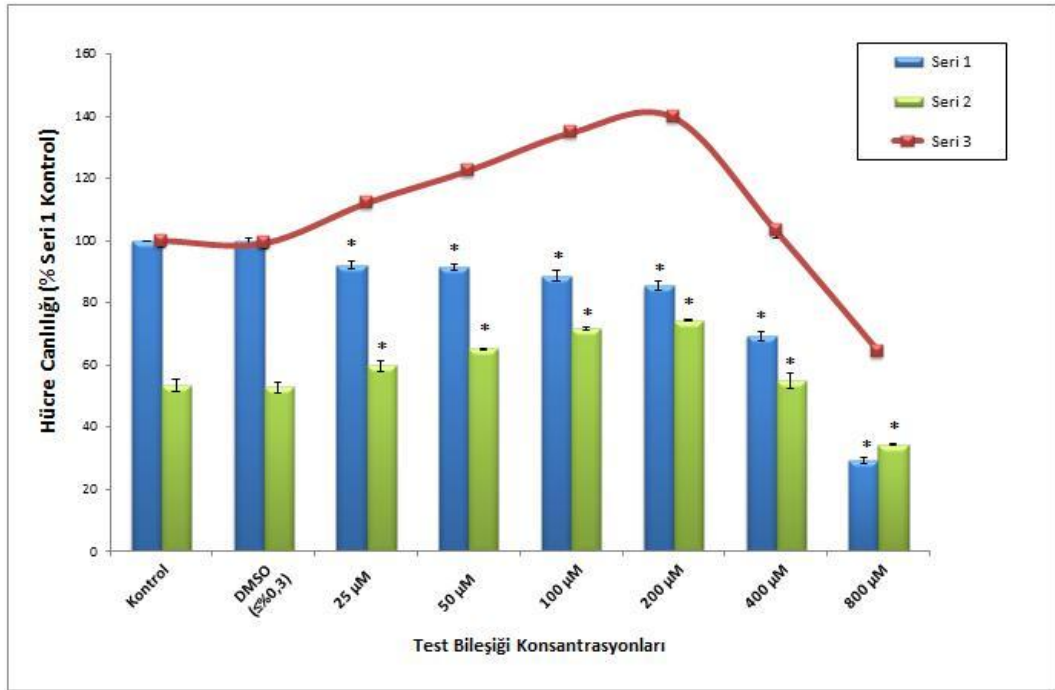


Şekil 3.3. Vulpinik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. Seri 1: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik aktivitesi, Seri 2: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonları + 2,5 J/cm² UV-B ışınının sitotoksik aktivitesi, Seri 3: Seri 2'nin kendine ait kontrol grubuna göre değerlendirilmesi. (*) işareti UV-B ışınlarına ve maddeye maruz kalmamış kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05

Vulpinik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine olan UV-B ışınlarına karşı koruyucu ve HaCaT hücreleri üzerine sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan MTT testi sonucuna göre; vulpinik asit bileşiği HaCaT hücreleri üzerine uygulanan konsantrasyonları ve deney yöntemine göre sitotoksik bir özelliğe sahip değildir. Bununla birlikte; test bileşiği uygulanan 2,5 J/cm² UV-B ışınına karşı HaCaT hücreleri için koruyucu ve UV-B absorbe edici bir etkiye sahiptir.

Uygulanan deney yönteminde $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışını HaCaT hücreleri üzerine yaklaşık olarak %50 oranında bir sitotoksiteye neden olurken, vulpinik asit bileşiği doza bağlı olarak bu sitotoksik etkiyi engelleyici bir aktivite göstermektedir; nitekim $800 \mu\text{M}$ yoğunluktaki test bileşiği UV-B ışınının sitotoksik etkisini yaklaşık %50'den %15'e kadar düşürmektedir.

3.1.4. Giroforik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri



Şekil 3.4. Giroforik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin MTT testi ile değerlendirilmesi. Seri 1: test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik aktivitesi, Seri 2: test bileşiğinin farklı konsantrasyonları + $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınının sitotoksik aktivitesi, Seri 3: seri 2'nin kendine ait kontrol grubuna göre değerlendirilmesi. (*) işareti UV-B ışınlarına ve maddeye maruz kalmamış kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri $p < 0,05$

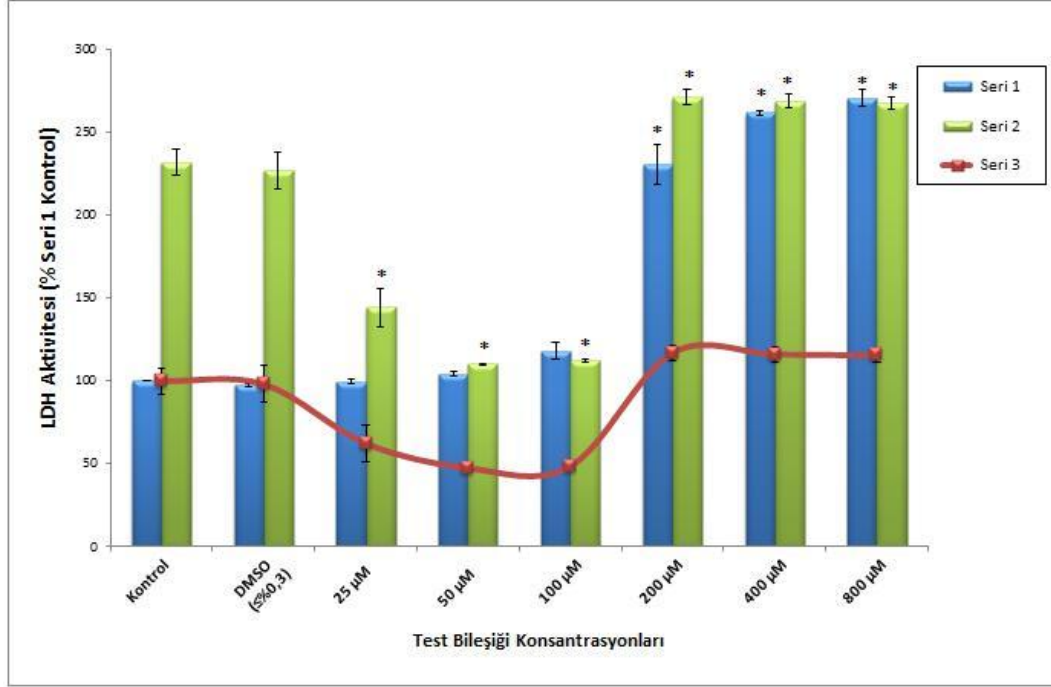
Giroforik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine olan UV-B ışınlarına karşı koruyucu ve HaCaT hücreleri üzerine sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan MTT testi sonucuna göre; giroforik asit bileşiği, HaCaT hücreleri üzerine

uygulanan test bileřiēi konsantrasyonları ve deney yöntemine göre düşük sitotoksik özelliēe sahiptir. Kontrol plakasında 400 µM'lık giroforik asit bileřiēi HaCaT hücreleri üzerine yaklaşık %30 oranında bir toksisite gösterirken, 2,5 J/cm² UV-B ışınına maruz bırakılan plakada 400 µM'lık konsantrasyon kontrolüne göre yaklaşık %5 oranında koruyucu etki göstermektedir. 25-50-100-200 µM'lık giroforik asit yoğunlukları ise doza baēımlı olarak HaCaT hücrelerini, UV-B ışınlarının toksisitesine karşı koruyucu aktivite göstermiştir.

3.2. Laktat Dehidrogenaz Testi (LDH) Sonuçları

(-) - usnik asit, atranorin, vulpinik asit ve giroforik asit bileşiklerinin 25-50-100-200-400 ve 800 µM konsantrasyonları HaCaT hücreleri üzerine uygulanarak *in vitro* sitotoksik etkilerinin ve 2,5 j/cm² UV-B ışınına karşı koruyucu etkilerinin LDH testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

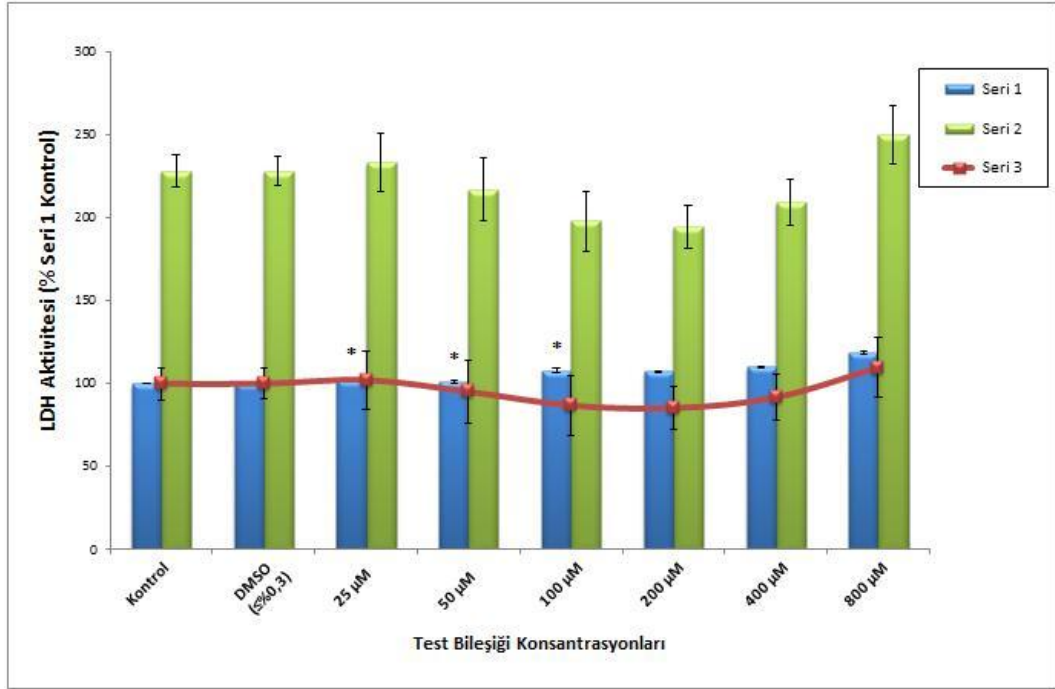
3.2.1. (-) - Usnik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri



Şekil 3.5. (-) - Usnik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi. Seri 1: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik aktivitesi, Seri 2: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonları + 2,5 J/cm² UV-B ışınının sitotoksik aktivitesi, Seri 3: Seri 2'nin kendine ait kontrol grubuna göre değerlendirilmesi. (*) işareti UV-B ışınlarına ve maddeye maruz kalmamış kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p < 0,05

(-) – usnik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine olan sitotoksik ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu etkisinin LDH aktivitesine bağlı olarak belirlenmesi amacıyla yapılan test tekniğine göre; 2,5 J/cm² UV-B ışını kontrole göre yaklaşık olarak %125 oranında LDH aktivitesi artışına neden olmaktadır. (-) – usnik asit bileşiğinin 200-400-800 µM olarak uygulanan konsantrasyonları ise HaCaT hücrelerinin hücre zarında hasar oluşturmuş veya hücreler üzerine öldürücü etki göstermiş, dolayısıyla LDH aktivitesinde kuvvetli bir artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, uygulanan 200-400-800 µM test bileşiği konsantrasyonları kontrollerine göre incelendiğinde; UV-B ışınlarına maruz bırakılmayan HaCaT hücreleri üzerinde kuvvetli bir LDH artırıcısıyken, UV-B ışınlarına maruz bırakılan HaCaT hücreleri üzerindeki LDH artırıcı etkileri daha azdır.

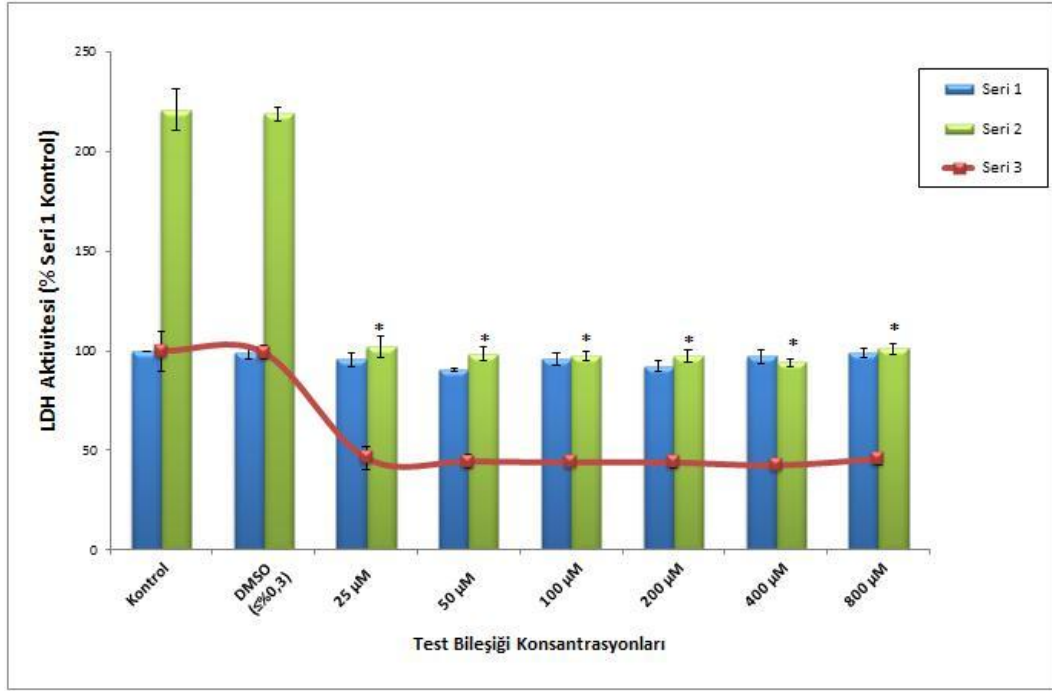
3.2.2. Atranorin bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri



Şekil 3.6. Atranorin bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi. Seri 1: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik aktivitesi, Seri 2: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonları + 2,5 J/cm² UV-B ışınının sitotoksik aktivitesi, Seri 3: Seri 2'nin kendine ait kontrol grubuna göre değerlendirilmesi. (*) işareti UV-B ışınlarına ve maddeye maruz kalmamış kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p < 0,05

Atranorin bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine olan sitotoksik ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu etkisinin LDH aktivitesine bağlı olarak belirlenmesi amacıyla yapılan test tekniğine göre; atranorin bileşiğinin uygulanan konsantrasyonları HaCaT hücreleri üzerine düşük oranda LDH aktivitesi artırıcı etki göstermiştir. Uygulan 100-200-400-800 µM test bileşiği yoğunlukları yaklaşık olarak %5 ile %20 aralığında konsantrasyona bağlı olarak LDH aktivitesi artışına neden olmuşlardır. 2,5 J/cm² UV-B ışınlarına maruz bırakılan HaCaT hücreleri üzerine uygulanan atranorin bileşiğinin 100-200-400 µM'lık yoğunlukları ise UV-B ışınlarının LDH artırıcı etkisini azalmaktadır.

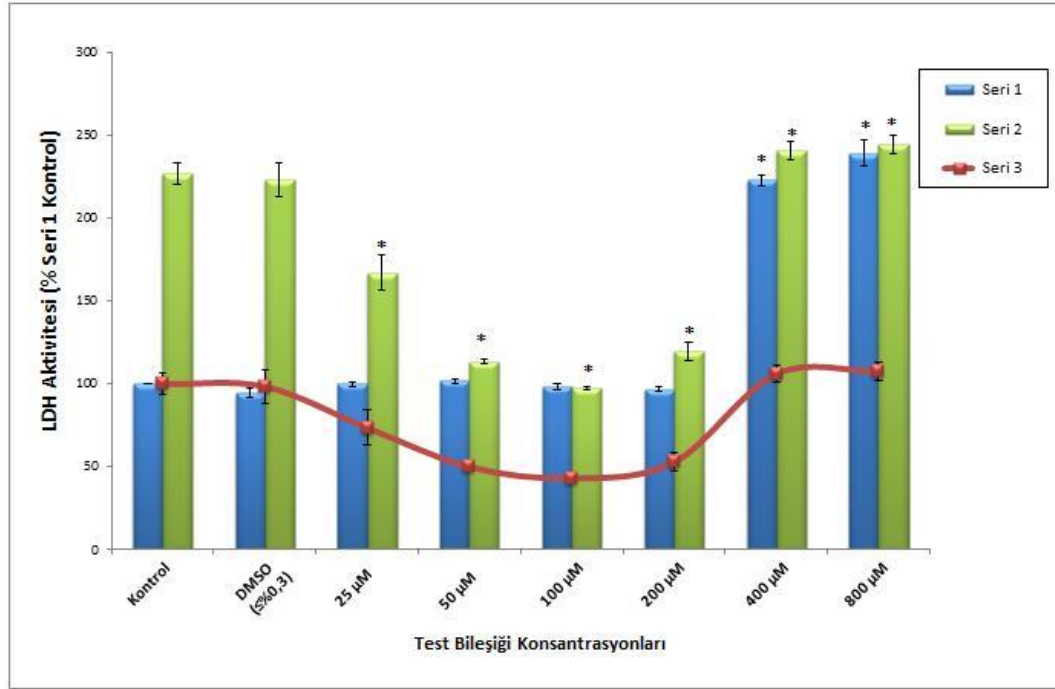
3.2.3. Vulpinik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri



Şekil 3.7. Vulpinik Asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi. Seri 1: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik aktivitesi, Seri 2: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonları + 2,5 J/cm² UV-B ışınının sitotoksik aktivitesi, Seri 3: Seri 2'nin kendine ait kontrol grubuna göre değerlendirilmesi. (*) işareti UV-B ışınlarına ve maddeye maruz kalmamış kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05

Vulpinik asit bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı koruyucu etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan LDH aktivitesi belirleme çalışmalarına göre; Uygulanan vulpinik asit konsantrasyonları HaCaT hücreleri üzerine LDH aktivitesi artırıcı etkiye sahip değildir. Ayrıca, UV-B ışınlarına maruz bırakılan HaCaT hücrelerinde oluşabilecek LDH aktivitesi artışını engelleyerek UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktivite göstermektedir.

3.2.4. Giroforik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine toksik etkileri ve UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktiviteleri



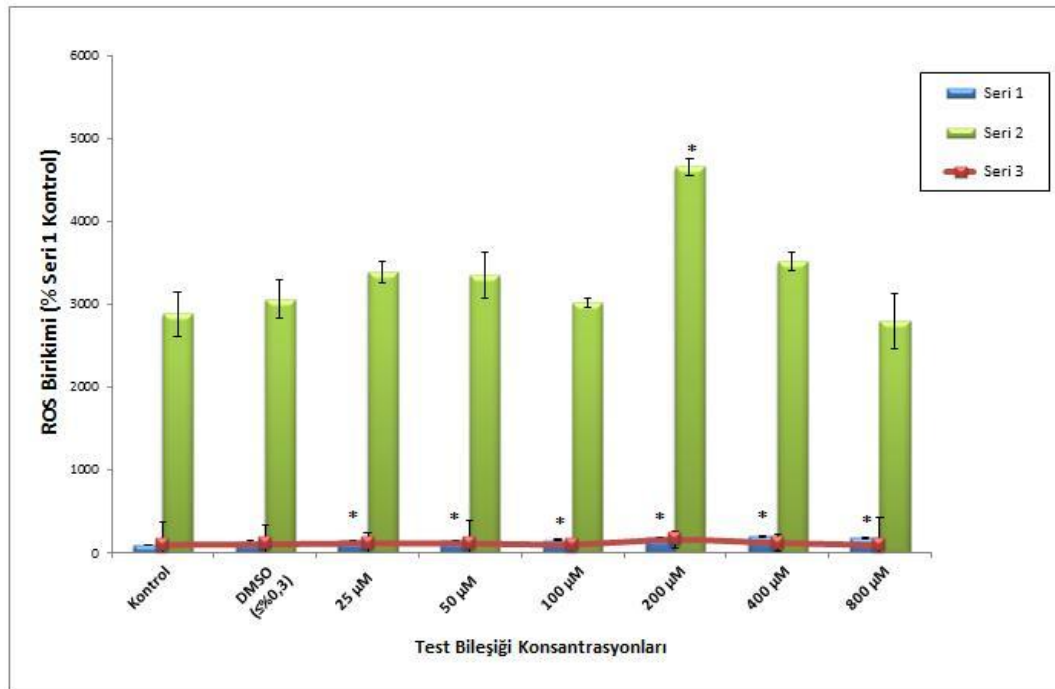
Şekil 3.8. Giroforik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin LDH testi ile değerlendirilmesi. Seri 1: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik aktivitesi, Seri 2: Test bileşiğinin farklı konsantrasyonları + 2,5 J/cm² UV-B ışınının sitotoksik aktivitesi, Seri 3: Seri 2'nin kendine ait kontrol grubuna göre değerlendirilmesi (*) işareti UV-B ışınlarına ve maddeye maruz kalmamış kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p < 0,05

Giroforik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine LDH aktivitesi artırıcı ve UV-B ışınlarının etkilerine karşı koruyucu özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan LDH aktivite testine göre; uygulanan 400 ve 800 µM yoğunluktaki giroforik asit bileşiği kontrole göre sırasıyla yaklaşık %125 ve %140 oranında artışa neden olmaktadır. UV-B ışınlarına maruz bırakılan HaCaT hücrelerinde ise giroforik asidin 25-50-100-200 µM konsantrasyonları LDH aktivitesinde azaltıcı etki göstermişlerdir. Bununla birlikte, uygulanan 400-800 µM konsantrasyonları kendi kontrollerine göre incelendiğinde; UV-B ışınlarına maruz bırakılmayan HaCaT hücreleri üzerinde kuvvetli bir LDH artırıcısıyken, UV-B ışınlarına maruz bırakılan HaCaT hücreleri üzerindeki LDH artırıcı etkileri daha azdır.

3.3. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Süpürücü Aktivite Testi Sonuçları

Yapılan çalışmalara göre; likenlerden izole edilen usnik asit, atranorin ve giroforik asit bileşikleri UV-B ışınlarının hücreler üzerine oluşturduğu reaktif oksijen türlerinin birikimine karşı antioksidan aktiviteye sahip oldukları tespit edilmiştir (Kohlhardt-Floehr ve ark. 2010; Molnár ve Farkas 2010; Bačkorová ve ark. 2012; Buçukoglu ve ark. 2012).

3.3.1. Vulpinik asit bileşiğinin ROS süpürücü aktivitesi



Şekil 3.9. Vulpinik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine ve UV-B ışınlarına karşı etkisinin ROS testi ile değerlendirilmesi. Seri 1: test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının sitotoksik aktivitesi, Seri 2: test bileşiğinin farklı konsantrasyonları + 2,5 J/cm² UV-B ışınının sitotoksik aktivitesi, Seri 3: seri 2'nin kendine ait kontrol grubuna göre değerlendirilmesi. (*) işareti UV-B ışınlarına ve maddeye maruz kalmamış kontrol grubuna göre anlamlı farklılıkları göstermektedir. Anlamlılık değeri p< 0,05

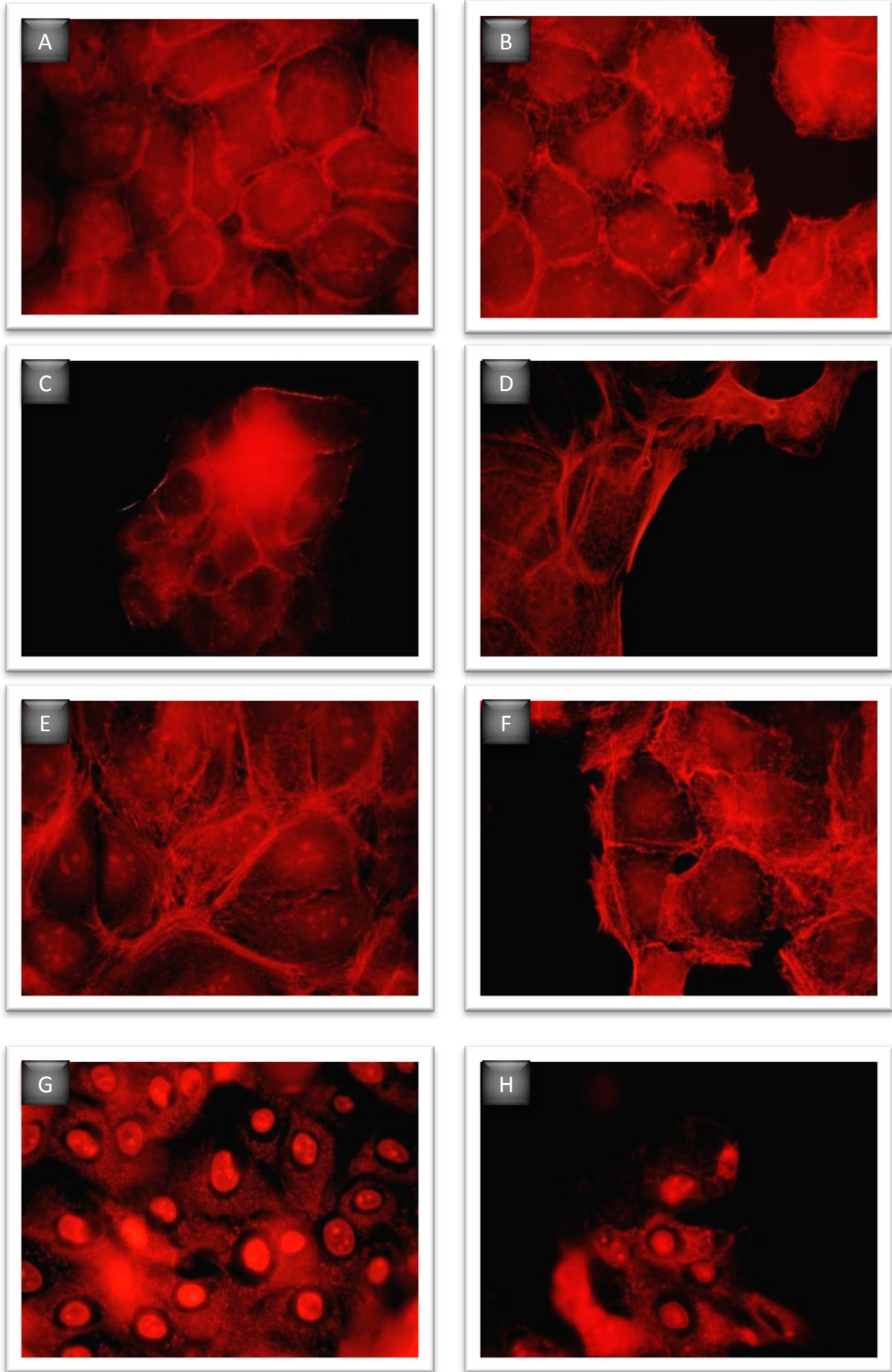
Vulpinik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine olan ROS süpürücü kapasitesini ve UV-B ışınlarına karşı ROS aktivitesi bağlamında koruyucu etkisini belirlemek amacıyla yapılan test tekniğine göre; vulpinik asit bileşiği UV-B ışınlarına maruz bırakılmayan kontrol plakasının kontrol grubuna göre doza bağlı olmak üzere ROS aktivitesini düşük seviyede artırıcı özelliktedir. Bununla birlikte

2,5 J/cm² UV-B ışını, kontrol plakasının kontrolüne göre yaklaşık %2700 oranında ROS artışına neden olurken, UV-B ve test maddesinin bazı dozları bu artışı daha da arttırmaktadır. Sonuç olarak, test bileşiği UV-B ışınlarının ROS aktivitesi üzerine etkisini engelleyici bir özelliğe sahip değildir, ancak UV-B ışınına maruz kalmayan hücreler içinde anlamlı bir ROS arttırıcı özelliği tespit edilmemiştir.

3.4. TRITC Phalloidin Boyama Yöntemi Sonuçları

3.4.1. (-) - Usnik asidin HaCaT hücrelerinin f-aktinleri üzerine etkisi

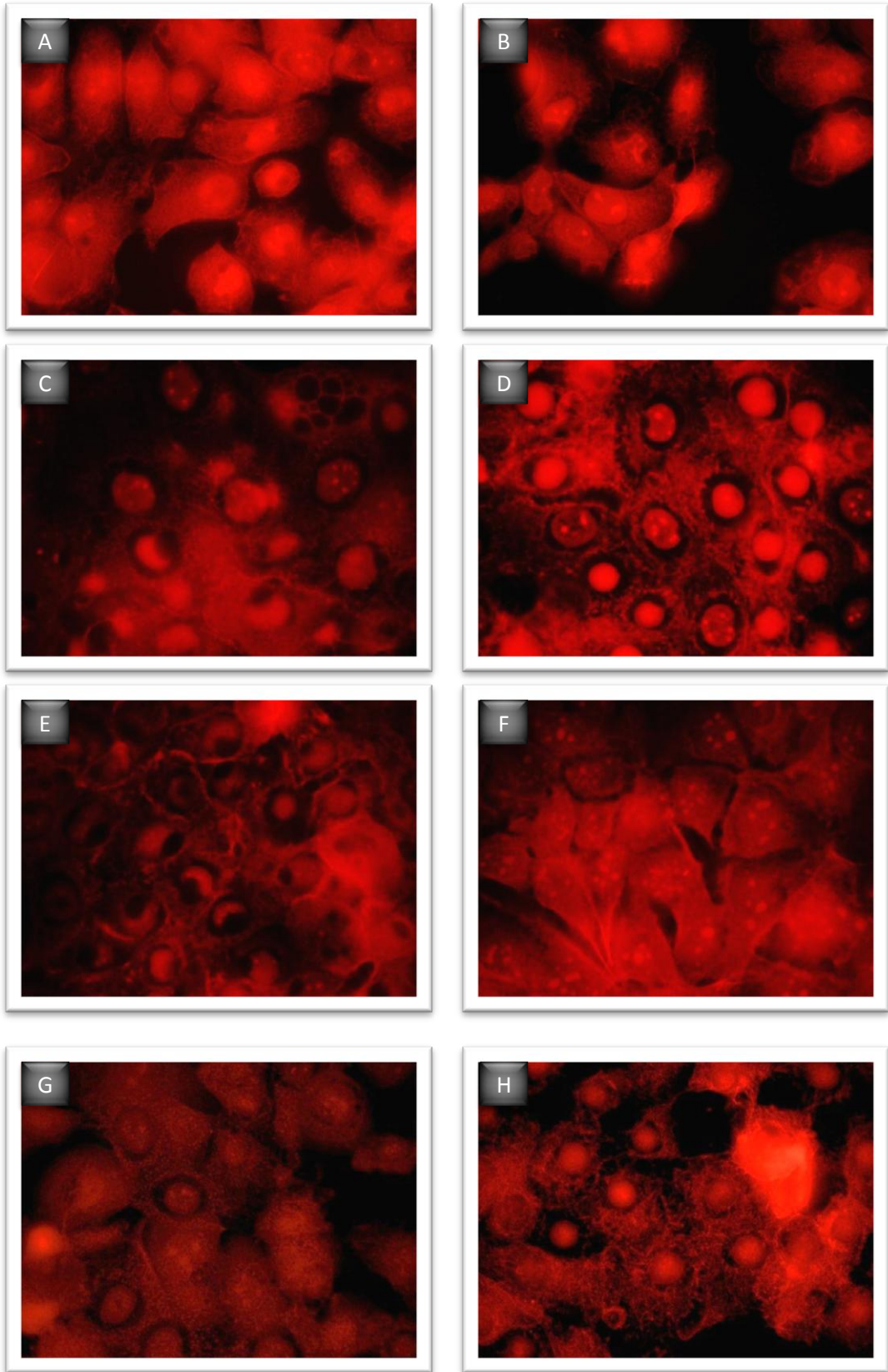
(-)- usnik asit bileşiğinin farklı dozlarının, HaCaT hücreleri üzerine uygulamasıyla f-aktinler üzerindeki etkisinin belirlenmesi çalışmaları sonucu elde edilen bilgilere göre; test bileşiğinin 400 ve 800 µM'lık konsantrasyonları f-aktinlerin depolimerize olmasına neden olarak, f-aktinleri morfolojik ve yapısal olarak değiştirmektedir. Test bileşiğinin uygulanan diğer konsantrasyonları ise f-aktinler üzerine herhangi bir etki göstermemektedir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. (-) - Usnik asit bileşiğinin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 µM D) 50 µM E) 100 µM F) 200 µM G) 400 µM H) 800 µM

3.4.2. (-) - Usnik asit bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin f-aktin komponentleri üzerinden incelenmesi

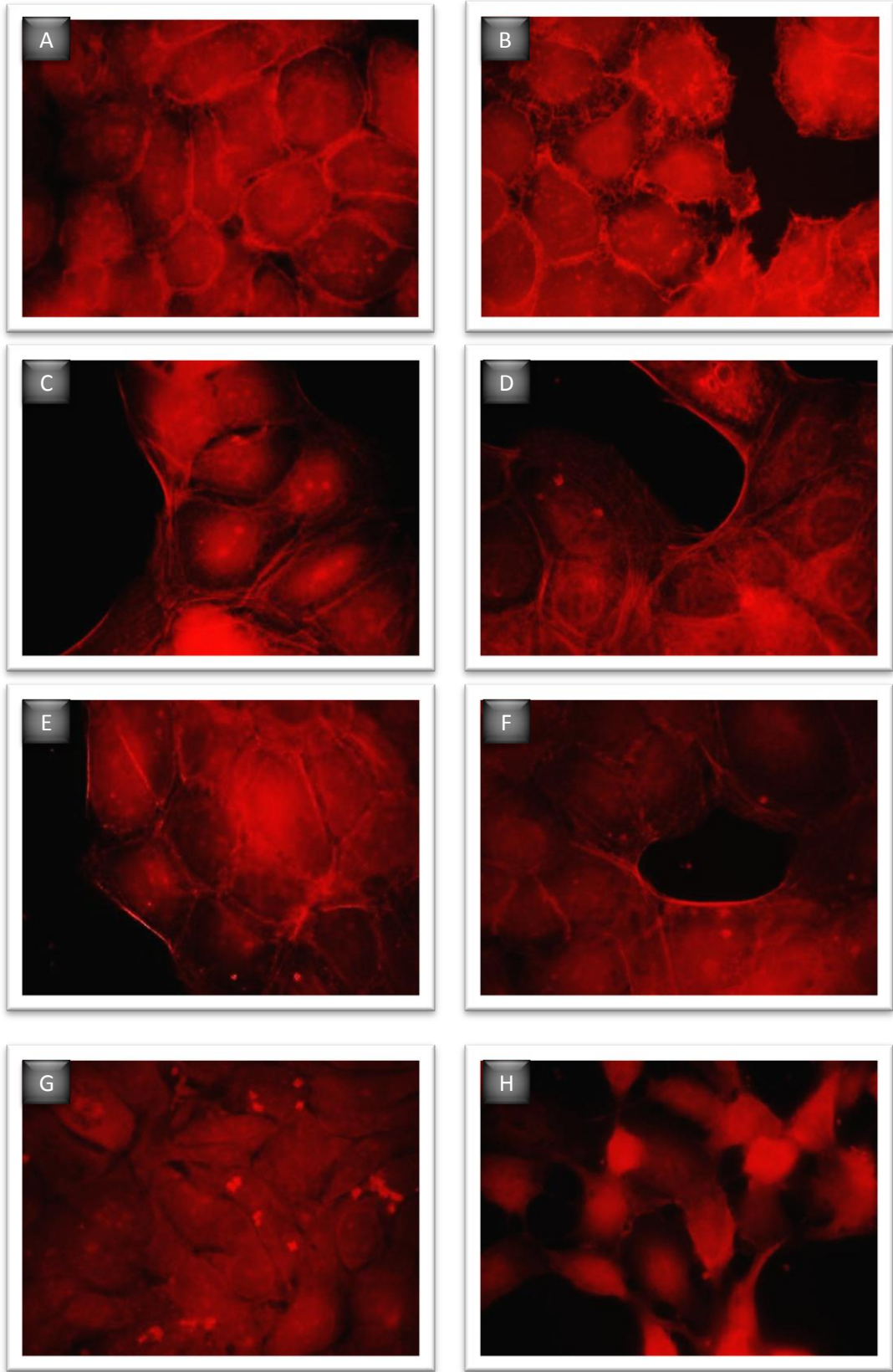
HaCaT hücreleri üzerine uygulanan 2,5 J/cm² doz UV-B ışınlarının, f-aktin Komponentlerini morfolojik ve yapısal olarak değiştirdiği belirlenmiştir. (-)- usnik asit bileşiğinin 100 ve 200 µM'lık konsantrasyonlarının UV-B ışınlarına karşı koruyucu etki gösterdiği ve f-aktin komponentlerinin depolimerize olmasını engellediği belirlenmiştir. Uygulanan 25 ve 50 µM'lık yoğunluklar f-aktin komponentlerinin depolimerize olmasını engelleme kapasitesine sahip değilken, 400 ve 800 µM'lık konsantrasyonlar f-aktin komponentlerini depolimerize edici aktivite göstermektedir. Bununla birlikte, UV-B ışınları hücreler üzerine f-aktin komponentleri dışında da etkilere sahiptir ve hücrelerin morfolojik olarak küçölmesine neden olmaktadır (şekil.3.11.).



Şekil 3.11. (-)- usnik asit bileşiğinin $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 µM D) 50 µM E) 100 µM F) 200 µM G) 400 µM H) 800 µM

3.4.3. Atranorin bileşiğinin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi

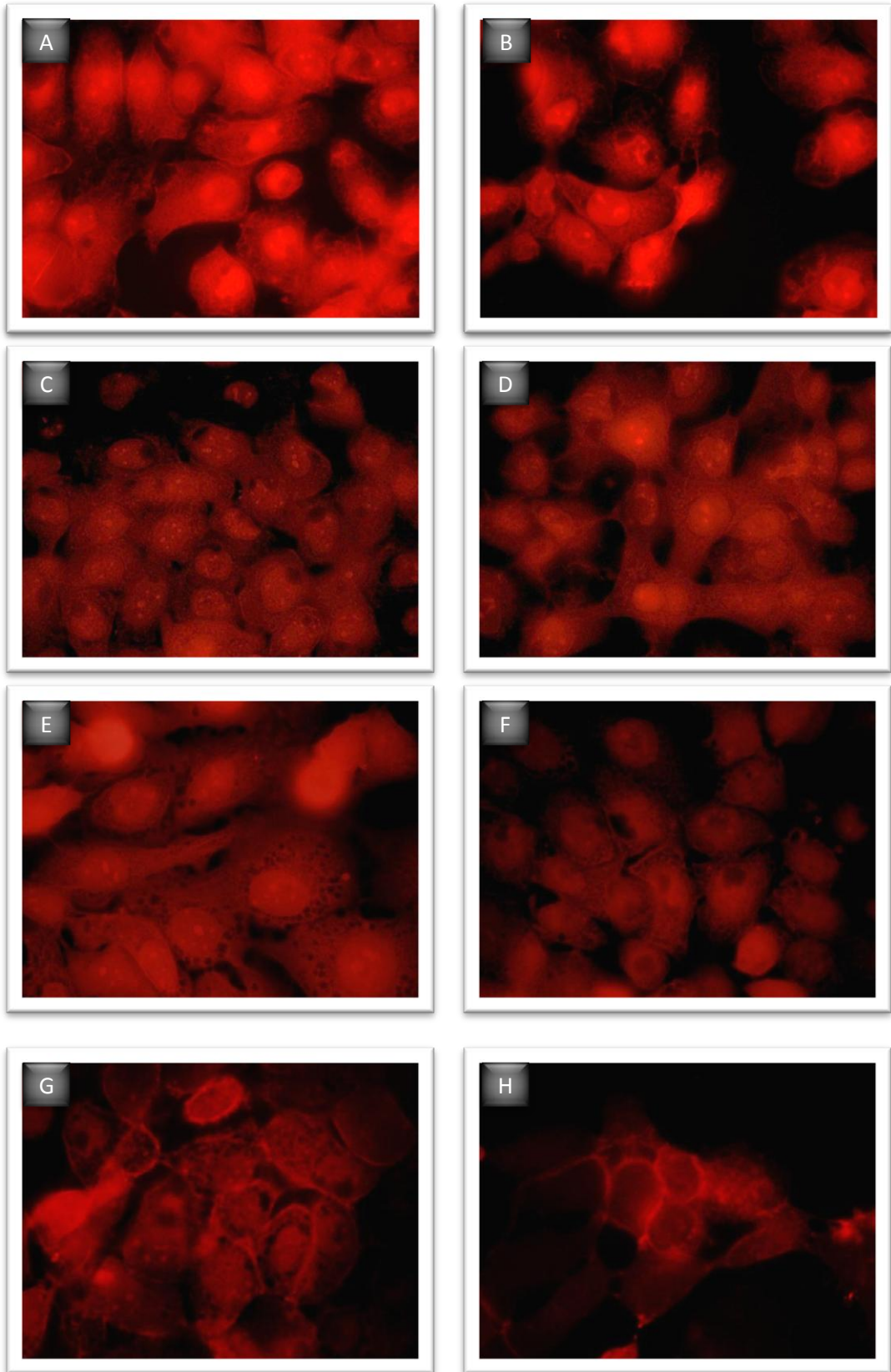
Atranorin bileşiğinin f-aktin komponentleri üzerine olan etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda; test bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerine uygulanması sonucunda, 25-50-100-200 μM 'lık atranorin konsantrasyonlarının f-aktin komponentleri üzerine herhangi bir etkiye sahip olmadığı gözlemlenmiştir. Atranorin bileşiğinin 400 ve 800 μM 'lık konsantrasyonları ise f-aktin komponentlerinde depolimerizasyona neden olmaktadır. Bununla birlikte, hücreler arası bağlantıların kopmadığı gözlemlenmiştir (şekil 3.12).



Şekil 3.12. Atranorin bileşiğinin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 µM D) 50 µM E) 100 µM F) 200 µM G) 400 µM H) 800 µM

3.4.4. Atranorin bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin f-aktin komponentleri üzerinden incelenmesi

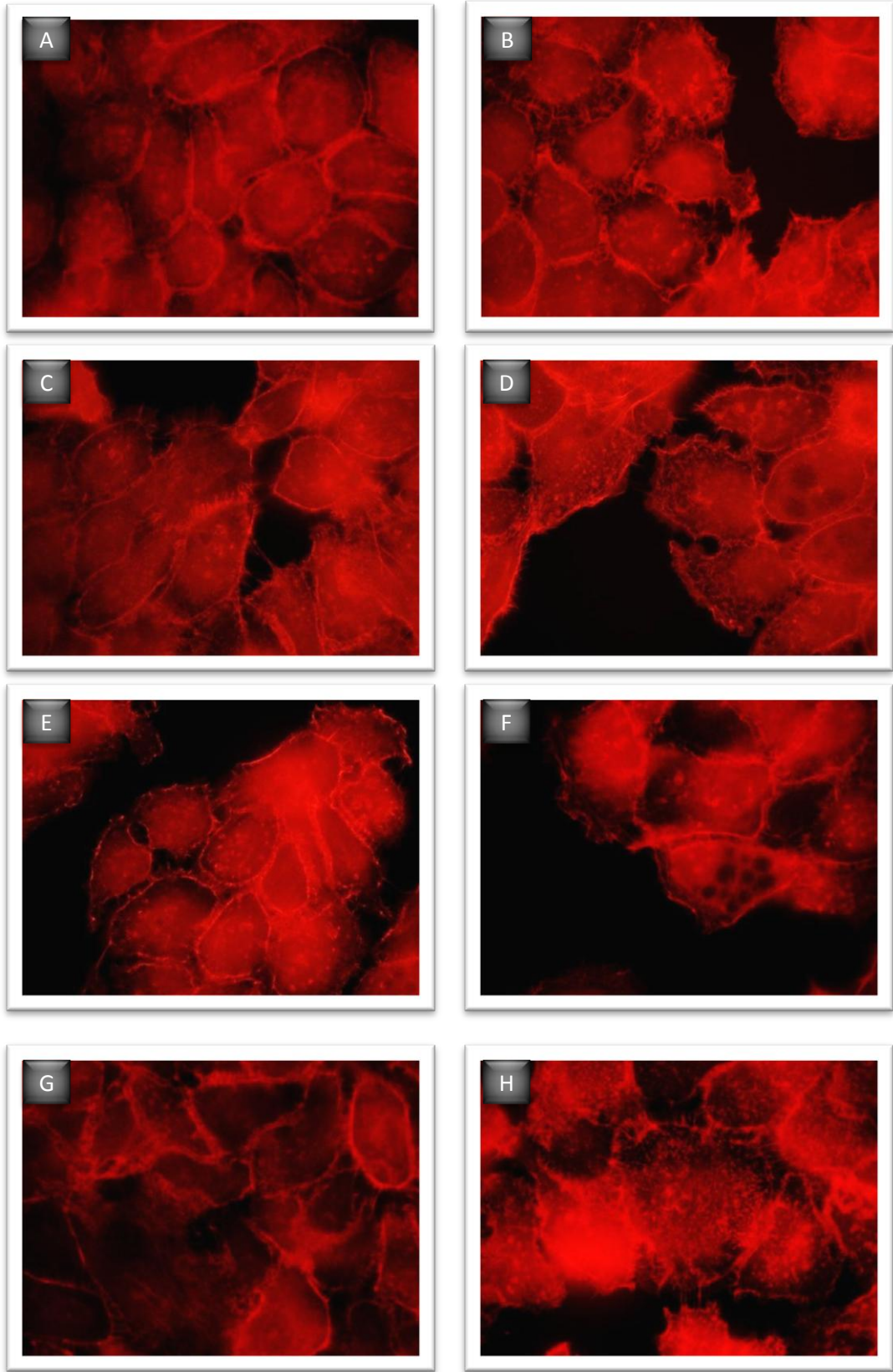
Atranorin bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı koruyucu etkisinin f-aktin komponentleri üzerinden belirlenmesi çalışmalarına göre; 2,5 J/cm² UV-B ışını f-aktin komponentlerinin depolarize olmasına neden olarak morfolojik ve yapısal değişime neden olmaktadır. Atranorin bileşiğinin 25 ve 50 µM'lık konsantrasyonlarının f-aktin komponentlerinde depolimerizasyonu engelleyici bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Atranorin bileşiğinin 100-200-400 ve 800 µM konsantrasyonlarının ise 2,5 J/cm² UV-B ışınına karşı koruyucu etki sağlayarak f-aktin komponentlerinin depolimerizasyonunu engellediği belirlenmiştir (Şekil.3.13.).



Şekil 3.13. Atranorin bileşiğinin $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) $25 \mu\text{M}$ D) $50 \mu\text{M}$ E) $100 \mu\text{M}$ F) $200 \mu\text{M}$ G) $400 \mu\text{M}$ H) $800 \mu\text{M}$

3.4.5. Vulpinik asidin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi

Vulpinik asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine madde 2.5.6. da belirtilen deney yönteminin uygulaması ile f-aktin komponentleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi testleri sonucu elde edilen bilgilere göre; test bileşiminin uygulanan konsantrasyonları f-aktin komponentleri üzerine morfolojik ve yapısal olarak anlamlı bir etkiye neden olmamaktadır (Şekil 3.14).

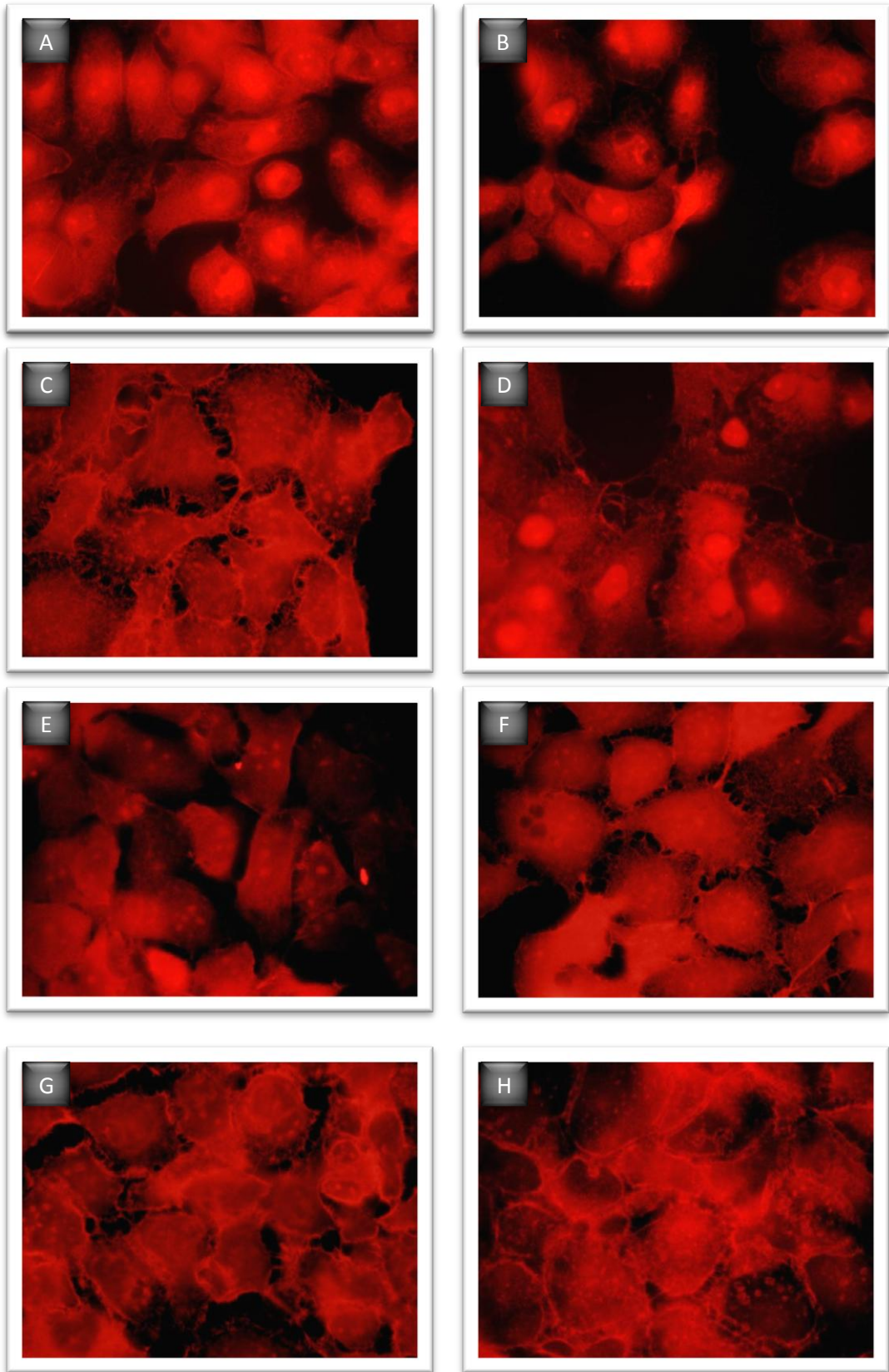


Şekil 3.14. Vulpinik asit bileşiğinin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi (100x)

A) Kontrol B) DMSO C) 25 μ M D) 50 μ M E) 100 μ M F) 200 μ M G) 400 μ M H) 800 μ M

3.4.6. Vulpinik asit bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin f-aktin komponentleri üzerinden incelenmesi

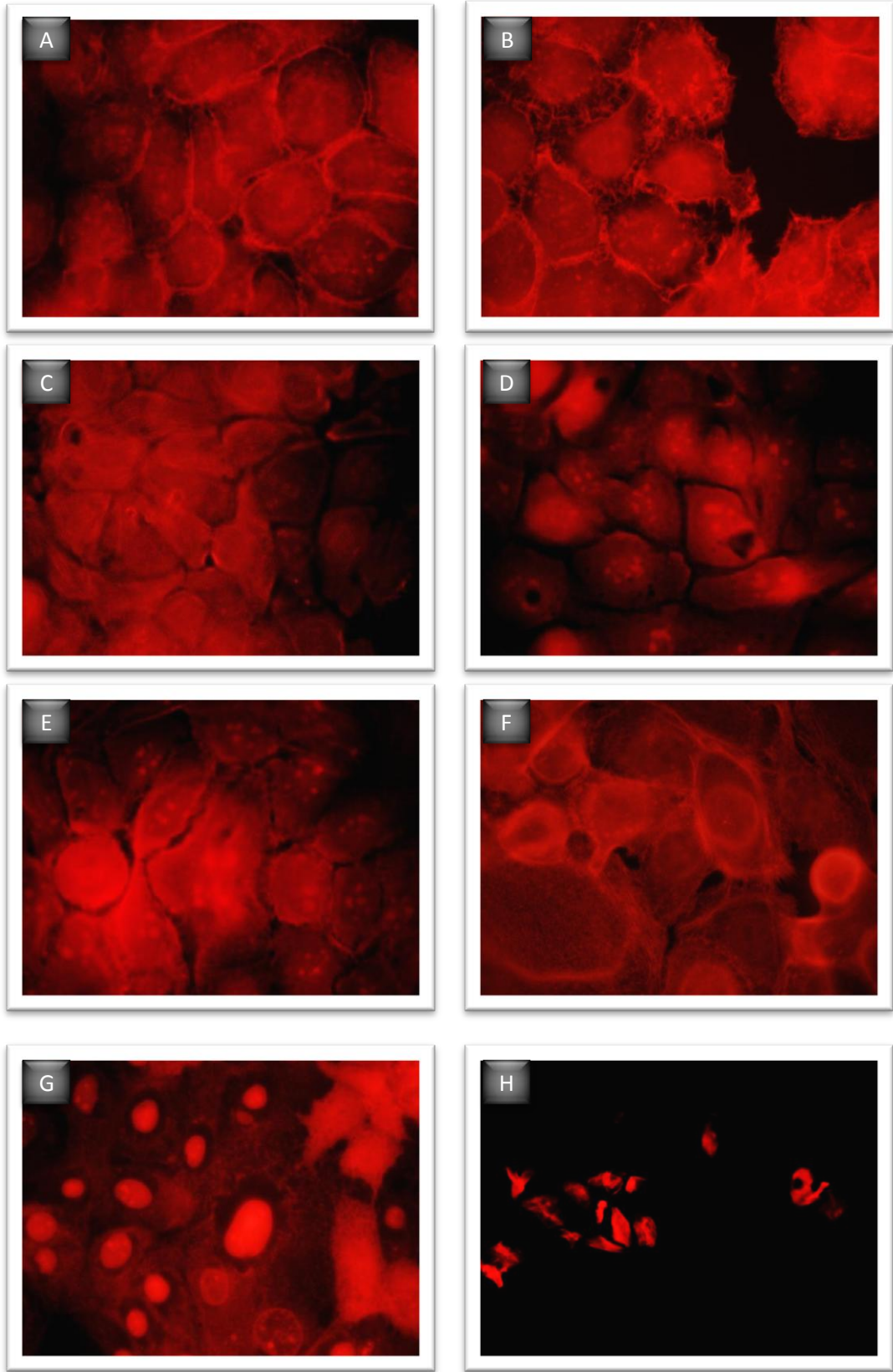
Vulpinik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine madde 2.5.6. da belirtilen deney yönteminin uygulaması ile $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına karşı koruyucu etkisinin f-aktin komponentleri üzerinden belirlenmesi testleri sonucu elde edilen bilgilere göre; $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışını, kontrol ve DMSO kontrol fotoğraflarında da görüldüğü üzere f-aktin komponentlerinin polimerizasyonunu ve morfolojisini engelleyici özellik taşımaktadır; bununla birlikte test bileşiği HaCaT hücreleri üzerine olan UV-B ışınının etkisini konsantrasyona bağlı olarak azaltmakta ve uygulanan en yüksek test bileşiği konsantrasyonu olan $800 \text{ } \mu\text{M}$ 'da f-aktin komponentlerinin polimer yapısı ve morfolojisi normal bir görünüme yaklaşmaktadır. Dolayısıyla; vulpinik asit bileşiğinin, UV-B ışınlarının f-aktin komponentleri üzerine olan depolarize edici etkisini engellediği görülmektedir (Şekil.3.15.).



Şekil 3.15. Vulpinik asit bileşiğinin $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 µM D) 50 µM E) 100 µM F) 200 µM G) 400 µM H) 800 µM

3.4.7. Giroforik asidin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi

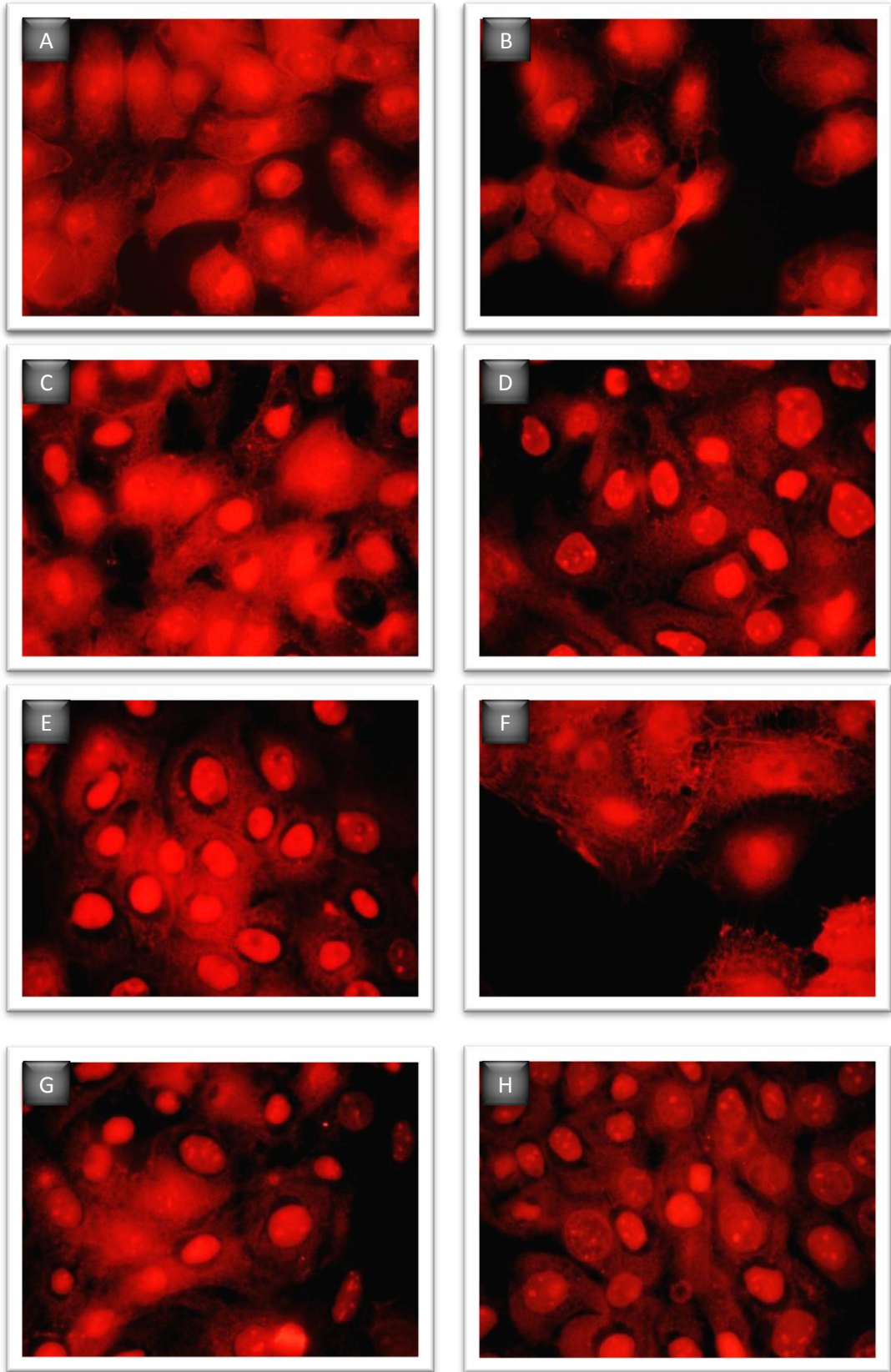
Giroforik asit bileşiminin farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerine madde 2.5.6. da belirtilen deney yöntemine göre uygulamasıyla f-aktin komponentleri üzerine etkisinin belirlenmesi testleri sonucu elde edilen bilgilere göre; test bileşiminin farklı konsantrasyonları f-aktin komponentleri üzerine morfolojik ve yapısal olarak yoğunluğa bağımlı bir etkiye sahiptir. Bununla birlikte, 400 μ M yoğunluğundaki giroforik asit f-aktin komponentleri üzerine depolimerize edici, 800 μ M yoğunluk ise hücreler üzerine toksik etki göstermektedir (Şekil 3.16.).



Şekil 3.16. Giroforik asit bileşiğinin HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 µM D) 50 µM E) 100 µM F) 200 µM G) 400 µM H) 800 µM

3.4.8. Giroforik asit bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin f-aktin komponentleri üzerinden incelenmesi

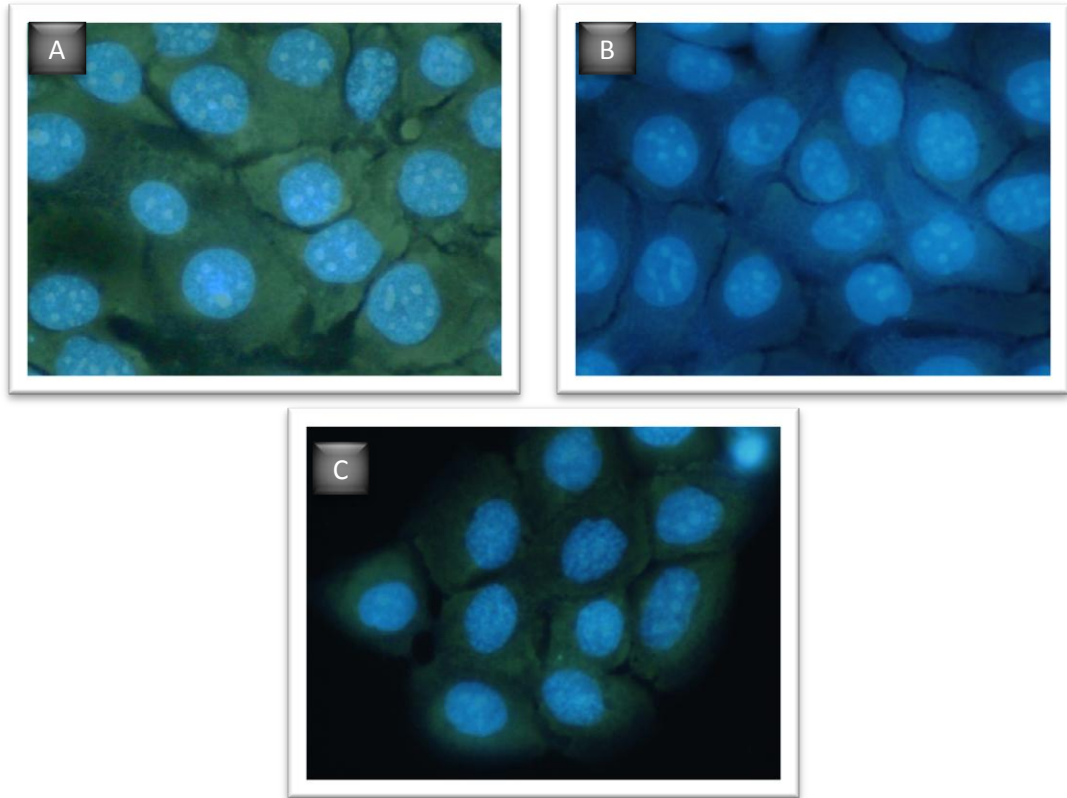
Giroforik asit bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının, HaCaT hücreleri üzerine madde 2.5.6. da belirtilen deney yöntemine göre uygulamasıyla $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına karşı sağladığı koruyucu etkinin f-aktin komponentleri üzerinden belirlenmesi testleri sonucu elde edilen bilgilere göre; $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışını, kontrol ve DMSO kontrol fotoğraflarında da görüldüğü üzere f-aktin komponentlerinin polimerizasyonunu ve morfolojisini değiştirici etkiye sahiptir. Bununla birlikte, test bileşiğinin 100 ve 200 μM 'lık konsantrasyonları UV-B ışınlarının f-aktin komponentleri üzerine olan etkisini kısmen engellemekte ve yoğunluğa bağlı olmak üzere f-aktin komponentlerinin polimerize yapısının değişimini azaltmaktadır. Uygulanan diğer konsantrasyonlarda ise f-aktin komponentleri depolimerize olarak gözlemlenmektedir. Giroforik asit bileşiğinin 25-50 μM 'lık yoğunlukları UV-B ışınlarına karşı yeterli derecede filtrasyon sağlayamazken, 400-800 μM 'lık yoğunluklar toksik etkileri nedeniyle f-aktin komponentlerinin depolimerize olmasına neden olmakta, morfolojik ve yapısal olarak değişimler gözlemlenmektedir. UV-B ışınlarının HaCaT hücreleri üzerine oluşturduğu etkinin, giroforik asit bileşiği tarafından kısmen engellenerek hücre morfolojisinin normale en yakın olduğu konsantrasyon uygulaması 200 μM olarak tespit edilmiştir (şekil.3.17.).



Şekil 3.17. Giroforik asit bileşiğinin $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentleri üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 µM D) 50 µM E) 100 µM F) 200 µM G) 400 µM H) 800 µM

3.5. DAPI Boyama Yöntemi Sonuçları

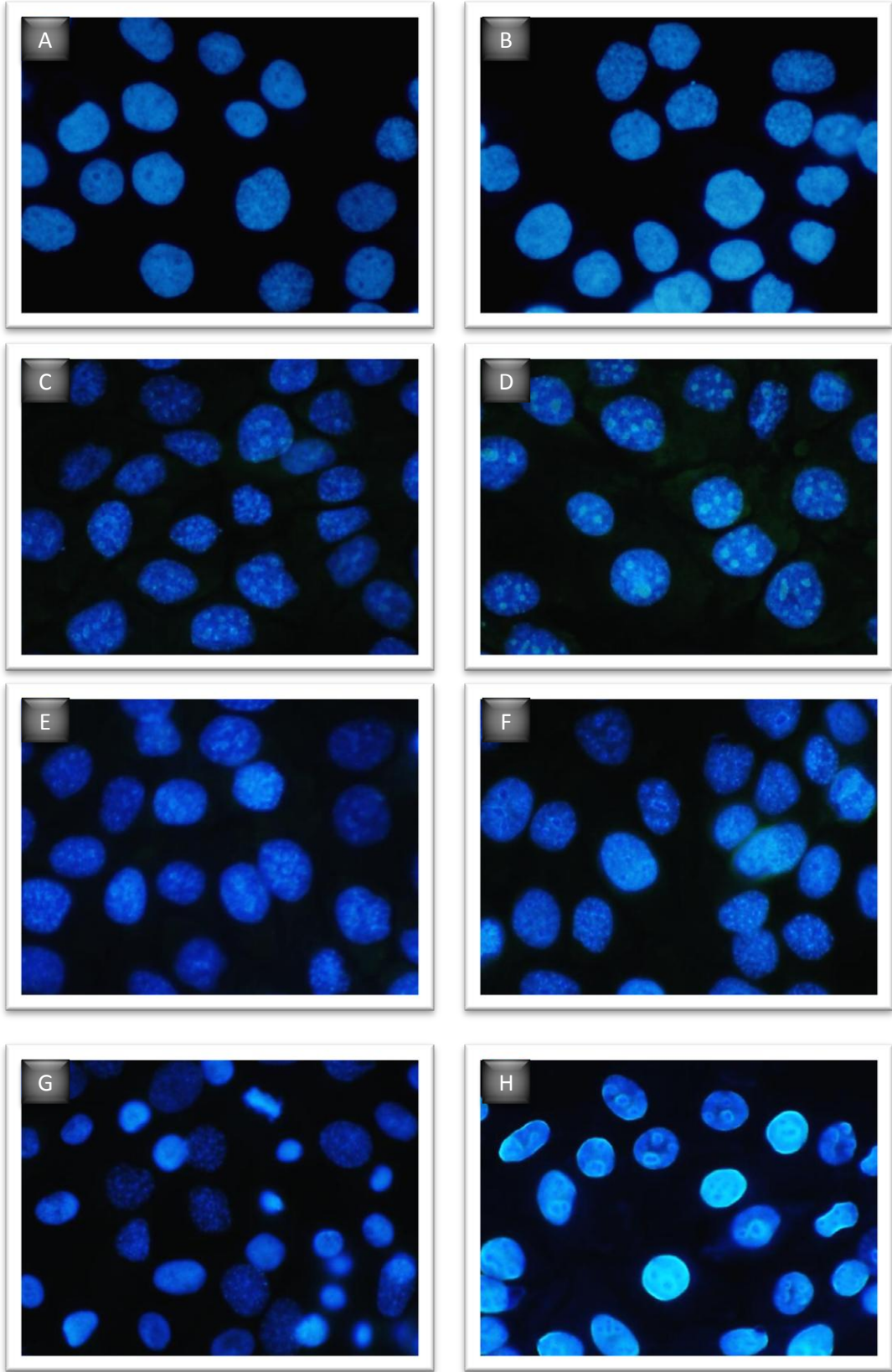
Test bileşiklerinin apoptotik etkilerinin belirlenmesi çalışmaları sırasında bazı test bileşiklerinin DAPI boyasının floresan ışına verdiği 358-461 nm dalga boyu aralığında ışına verdiği tespit edilmiştir (Olympus BX50 mikroskop NU filtre). DAPI boyama yönteminin asıl amacı hücre çekirdeğinde meydana gelen morfolojik değişimleri gözlemlemektir. Dolayısıyla, incelenen preparatlardan fotoğraflar çekilirken ve çekildikten sonra, test bileşiklerinin hücre sitoplazmasında oluşturduğu ışmanın göz ardı edilmesi amacıyla, netlik değerleri $\approx$ %50 oranında, kontrast değerleri $\approx$ %50 oranında, parlaklık ise $\approx$ %20 oranında arttırılmıştır. Test bileşiklerine ait ışımlar şekil 3.18’de gösterilmektedir.



Şekil 3.18. Test bileşiklerinin 358-461 nm dalga boyunda ışına göstermesi (100x)
A) (-) – usnik asit B) atranorin C) giroforik asit

3.5.1. (-)- Usnik asidin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi

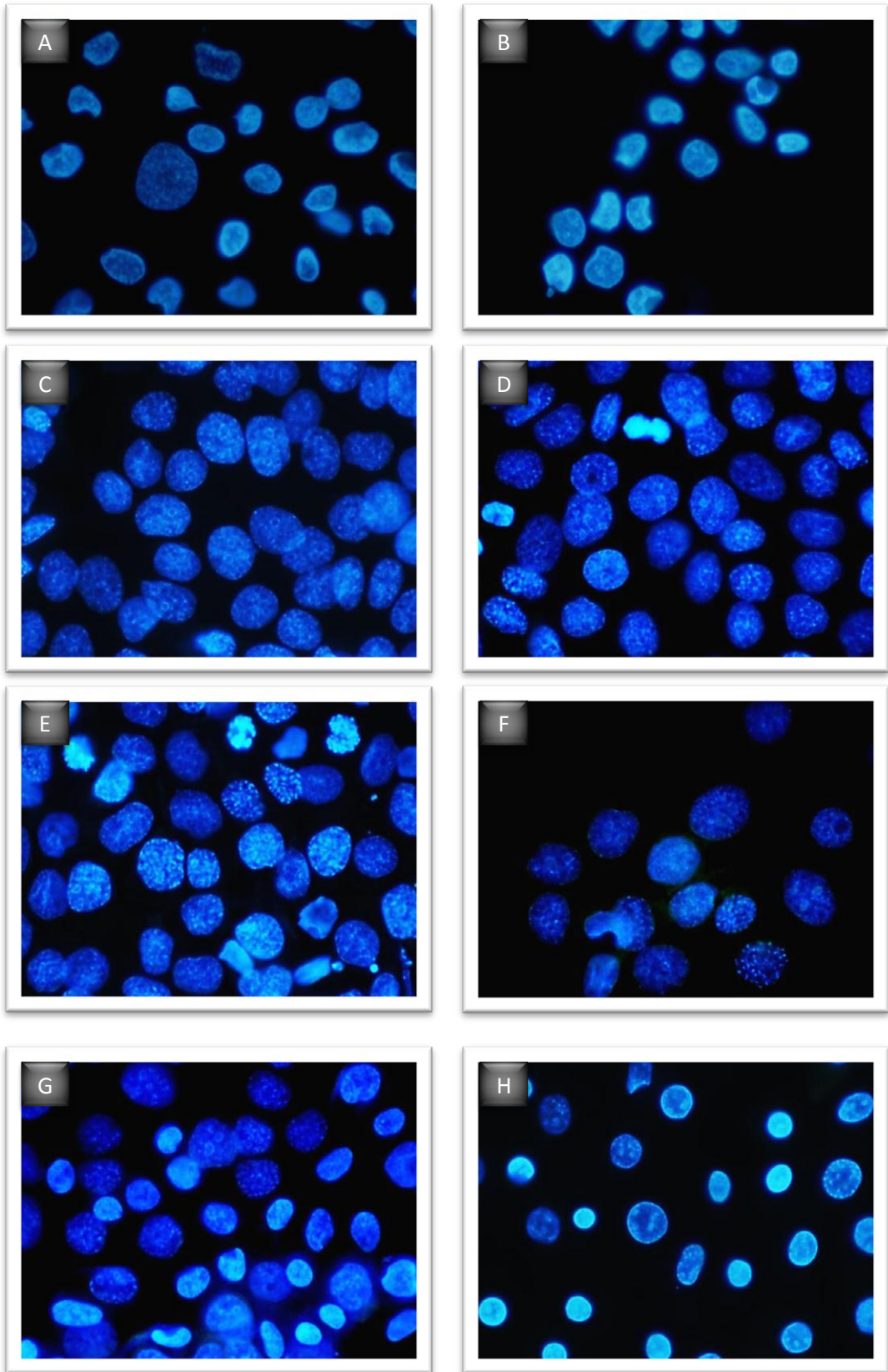
(-) – usnik asit bileşiminin farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerine apoptotik etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda; 25-50-100 ve 200 μM 'lık (-)- usnik asit konsantrasyonlarının DNA materyalini etkilemeyerek apoptotik etki yaratmadığı belirlenmiştir. (-)- usnik asidin 400 ve 800 μM 'lık konsantrasyonları ise genetik materyalde kayba neden olarak hücre çekirdeğinde hacimsel küçülmeye neden olmakta ve apoptotik etkiler gözlemlenmektedir (Şekil3.19.).



Şekil 3.19. (-)- Usnik asit bileşiğinin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 µM D) 50 µM E) 100 µM F) 200 µM G) 400 µM H) 800 µM

3.5.2. (-)- Usnik asit bileşişinin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin genetik materyal üzerinden incelenmesi

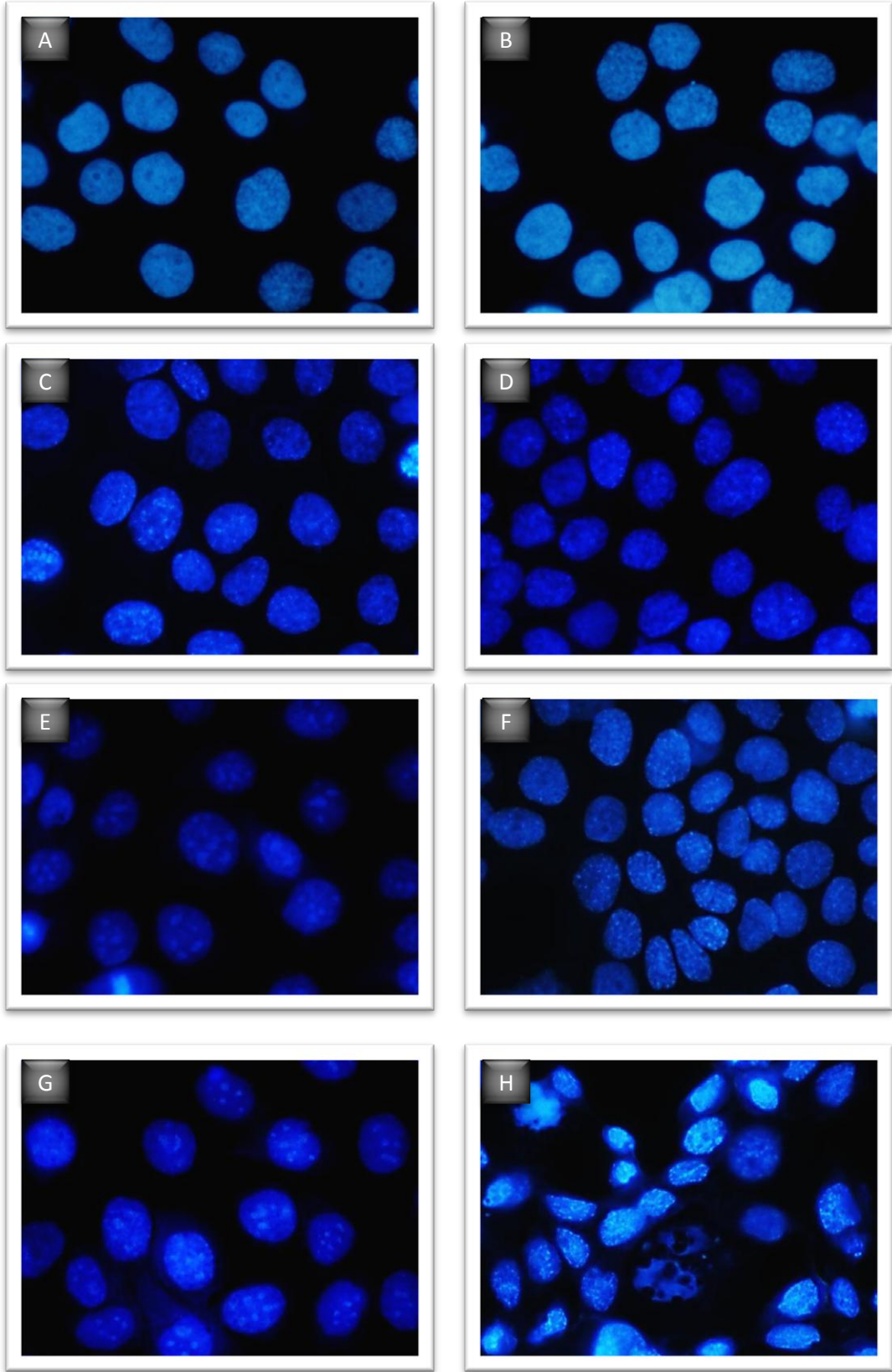
(-)- usnik asit bileşişinin farklı konsantrasyonlarının, HaCaT hücreleri üzerine madde 2.5.7’de belirtilen deney yöntemine göre uygulamasıyla $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına karşı sağladığı koruyucu etkisinin genetik materyal üzerinden belirlenmesi testleri sonucu elde edilen bilgilere göre; $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışını, kontrol ve DMSO kontrol fotoğraflarında da görüldüğü üzere; UV-B ışınları HaCaT hücrelerinin genetik materyalinin yapısını değiştirmekte ve çekirdek morfolojisini bozmaktadır. Bununla birlikte, test bileşişinin 25, 50 ve $100 \text{ } \mu\text{M}$ ’lık konsantrasyonları UV-B ışınlarının DNA materyali üzerine olan etkisini engelleyerek yoğunluğa bağlı olmak üzere çekirdek morfolojisini ve yapısını korumaktadır. Uygulanan diğer konsantrasyonlarda ise çekirdek morfolojisinde apoptotik etkiler gözlemlenmektedir (Şekil.3.20.).



Şekil 3.20. (-)- Usnik asit bileşiğinin $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 µM D) 50 µM E) 100 µM F) 200 µM G) 400 µM H) 800 µM

3.5.3. Atranorin bileşiğinin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi

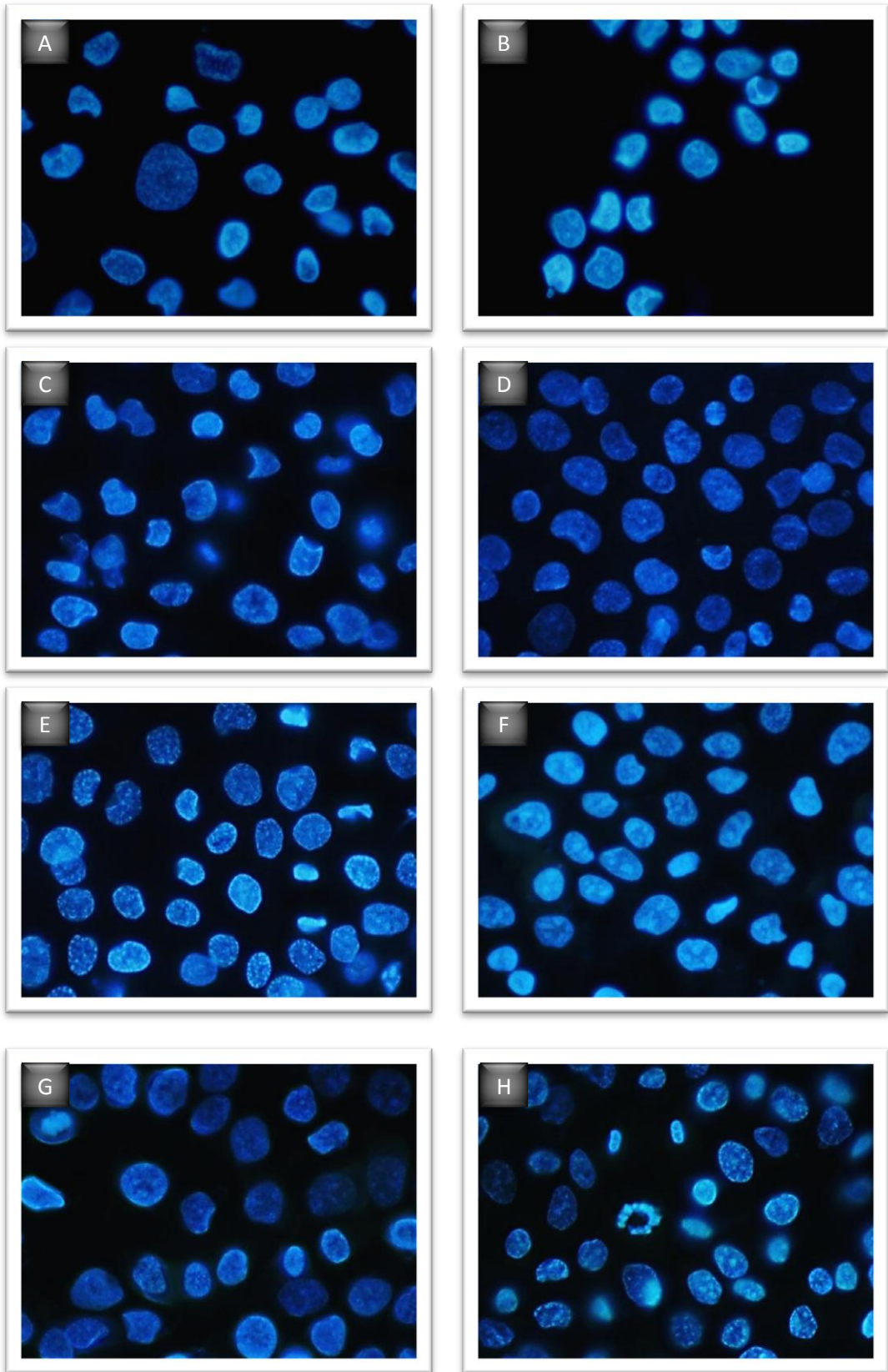
Atranorin bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerine apoptotik etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda; 25-50-100-200 ve 400 μM 'lık atranorin bileşiği konsantrasyonlarının HaCaT hücrelerinin çekirdek materyalini etkilemeyerek, apoptotik etki yaratmadığı belirlenmiştir. Atranorin bileşiğinin 800 μM 'lık konsantrasyon ise genetik materyalde kayba neden olarak hücre çekirdeğinde hacimsel küçülmeye neden olmakta ve apoptotik etkiler gözlemlenmektedir (şekil 3.21.).



Şekil 3.21. Atranorin bileşiğinin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 μ M D) 50 μ M E) 100 μ M F) 200 μ M G) 400 μ M H) 800 μ M

3.5.4. Atranorin bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin genetik materyal üzerinden incelenmesi

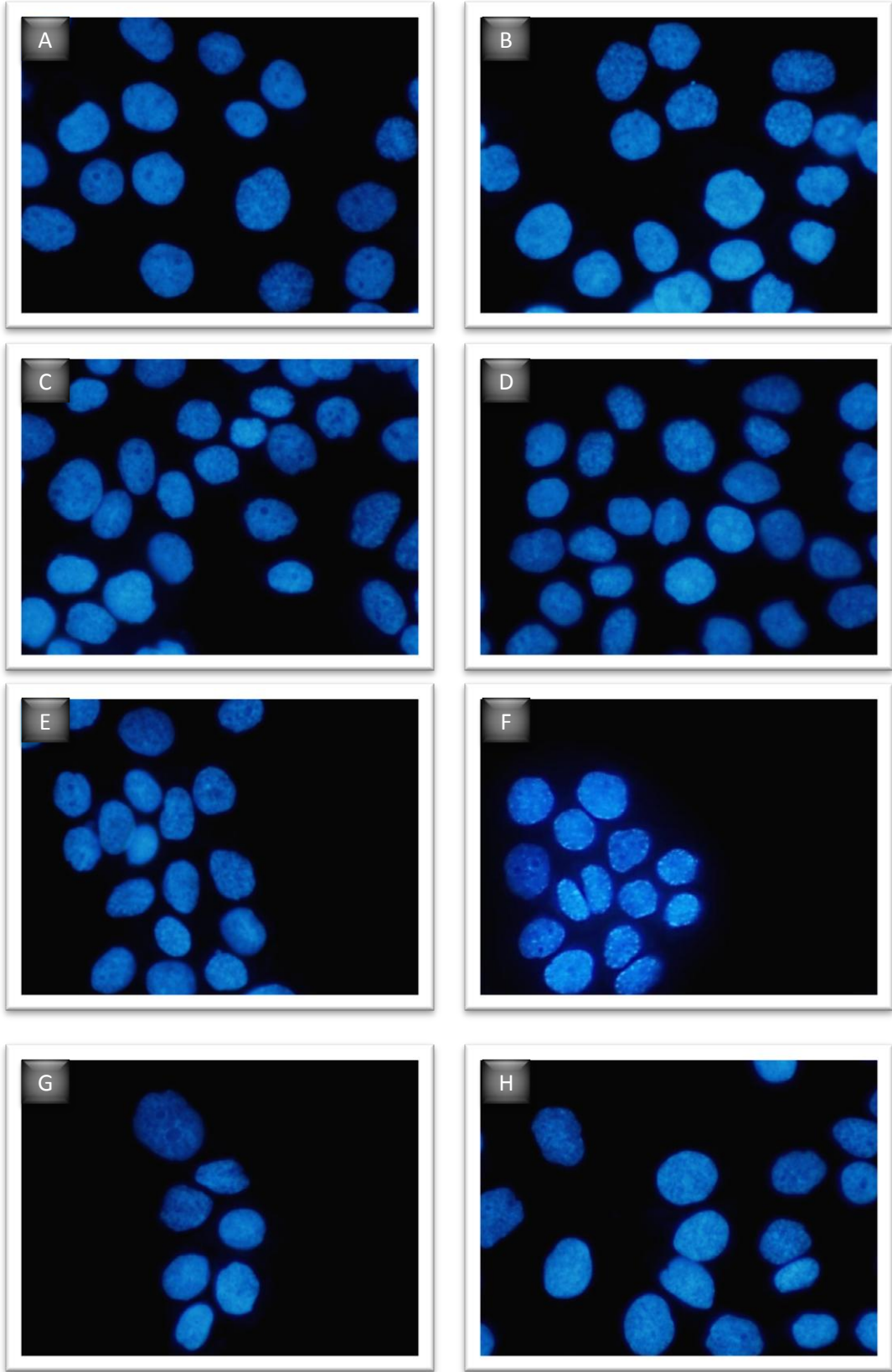
Atranorin bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının, 2,5 J/cm² UV-B ışınları nedeniyle oluşan apoptotik etkilere karşı koruyucu etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışma sonucunda elde edilen bilgilere göre; uygulanan atranorin bileşiği konsantrasyonlarının UV-B nedeniyle oluşan apoptotik etkileri engelleyemediği tespit edilmiştir (şekil 3.22.).



Şekil 3.22. Atranorin bileşiğinin $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 µM D) 50 µM E) 100 µM F) 200 µM G) 400 µM H) 800 µM

3.5.5. Vulpinik asidin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi

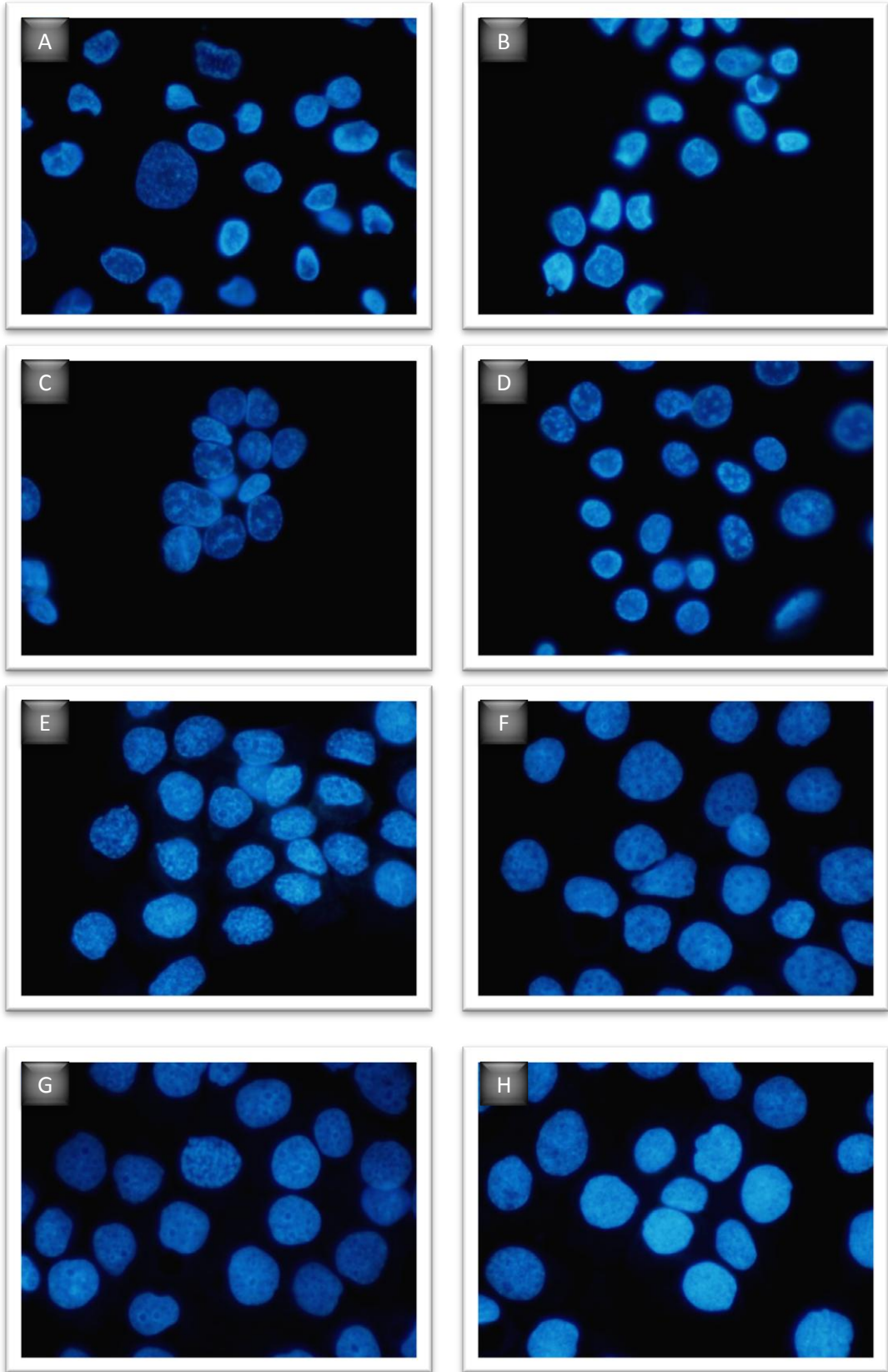
Vulpinik asit bileşiminin HaCaT hücreleri üzerine apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla uygulanan testler sonucu elde edilen bilgilere göre; test bileşiğı HaCaT hücreleri üzerine apoptotik bir özelliğı sahip değildir. Test bileşiminin uygulanan en yüksek konsantrasyonu olan 800 μ M dahi HaCaT hücrelerinde apoptoza yönlendirici bir etki göstermemekte ve hücre çekirdeğinin morfolojisinde herhangi bir değışime neden olmamaktadır (Şekil 3.23.).



Şekil 3.23. Vulpinik asit bileşiğinin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 µM D) 50 µM E) 100 µM F) 200 µM G) 400 µM H) 800 µM

3.5.6. Vulpinik asit bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin genetik materyal üzerinden incelenmesi

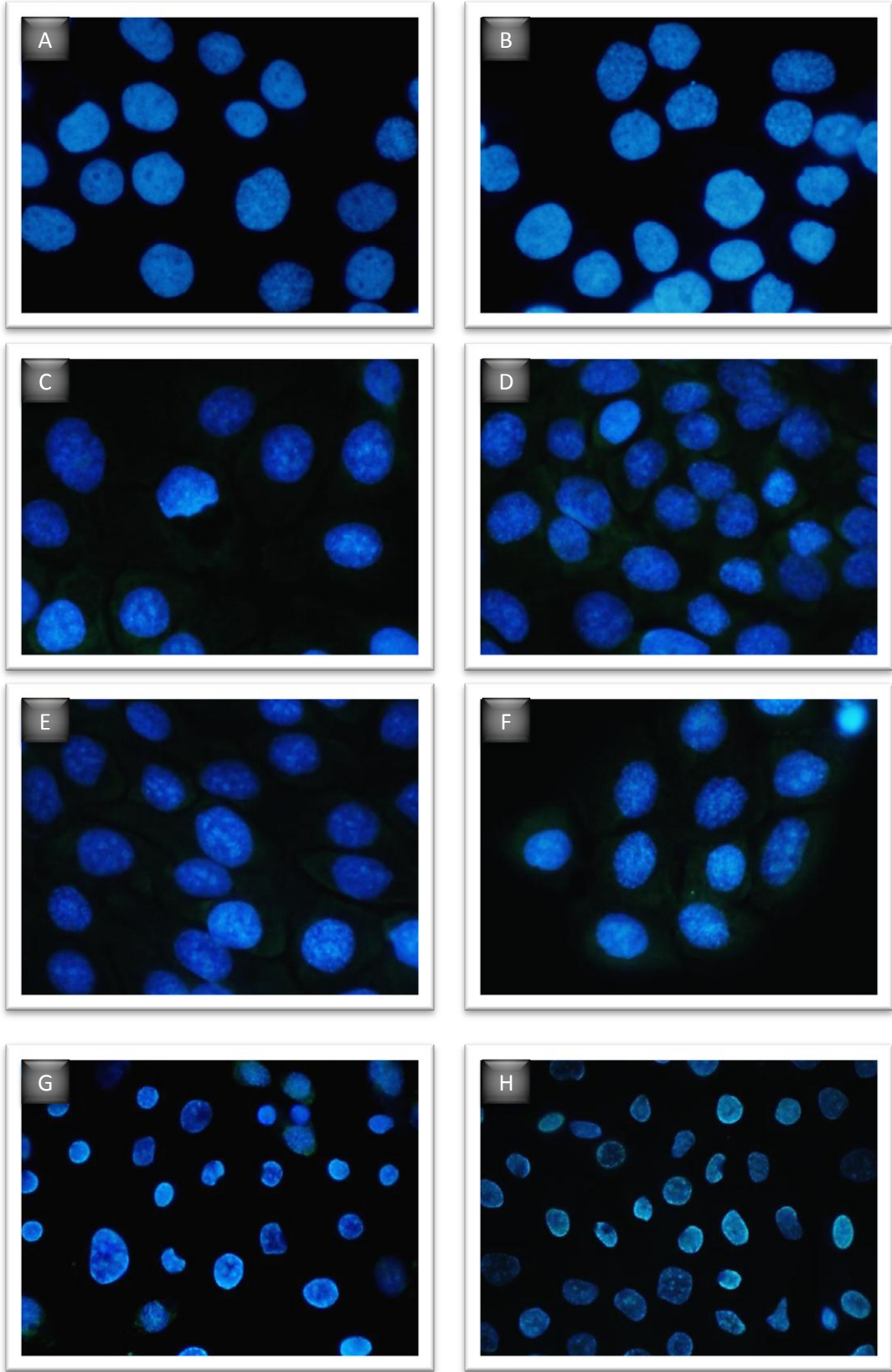
Vulpinik asit bileşiğinin HaCaT hücreleri üzerine uygulanan $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına karşı sağladığı, apoptotik etkiye karşı koruyucu aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan testler sonucu elde edilen bilgilere göre; test bileşiğinin uygulanan dozları, UV-B ışınının etkisini yoğunluğa bağlı olarak azaltmaktadır. Test bileşiğinin uygulanan en yüksek konsantrasyonu $800 \text{ } \mu\text{M}$ da hücre çekirdeklerinin morfolojisi normal bir görünüme sahiptir. Dolayısıyla; vulpinik asit bileşiği, UV-B ışınlarının etkisiyle hücre çekirdeği üzerinde oluşan apoptotik oluşumları engellemektedir (şekil 3.24.).



Şekil 3.24. Vulpinik asit bileşiğinin $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 µM D) 50 µM E) 100 µM F) 200 µM G) 400 µM H) 800 µM

3.5.7. Giroforik asidin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi

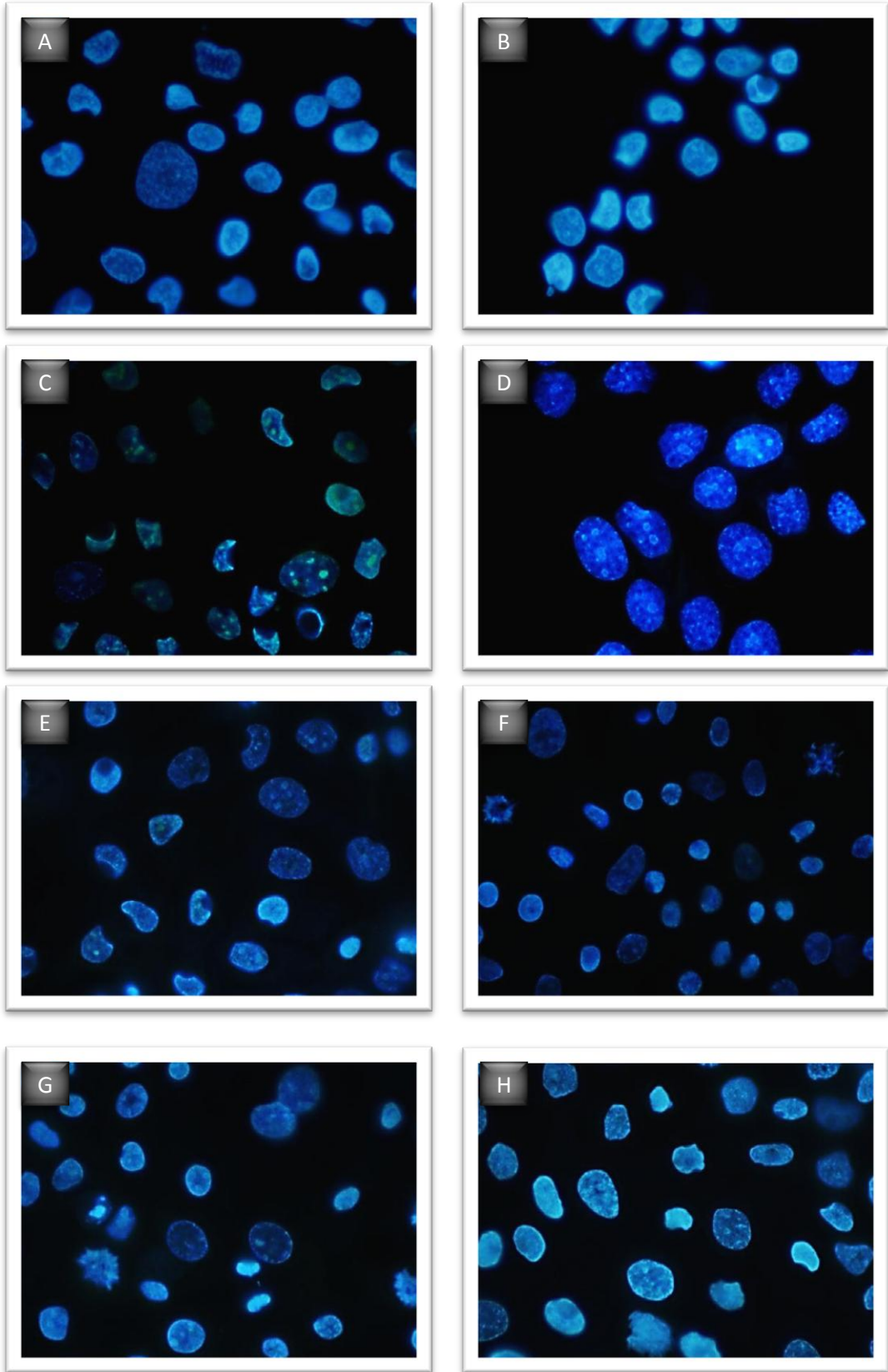
Giroforik asit bileşiminin farklı konsantrasyonlarının HaCaT hücreleri üzerine apoptotik etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışma sonucunda; 25-50-100 ve 200 μM 'lık giroforik asit konsantrasyonlarının DNA materyalini etkilemeyerek, apoptotik etki yaratmadığı belirlenmiştir. Giroforik asidin 400 ve 800 μM 'lık konsantrasyonları ise genetik materyalde kayba neden olarak hücre çekirdeğinde hacimsel küçülmeye neden olmakta ve apoptotik oluşumlar gözlemlenmektedir (Şekil 3.25.).



Şekil 3.25. Giroforik asit bileşiğinin HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) 25 μ M D) 50 μ M E) 100 μ M F) 200 μ M G) 400 μ M H) 800 μ M

3.5.8. Giroforik asit bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı HaCaT hücrelerini koruyucu etkisinin genetik materyal üzerinden incelenmesi

Giroforik asit bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının, HaCaT hücreleri üzerine madde 2.5.7. de belirtilen deney yöntemine göre uygulamasıyla 2,5 J/cm² UV-B ışınına karşı sağladığı koruyucu etkisinin genetik materyal üzerinden belirlenmesi testleri sonucu elde edilen bilgilere göre; test bileşiğinin 50 µM'lık konsantrasyonu UV-B ışınlarının DNA materyali üzerine olan etkisini kısmen engelleyerek, çekirdek morfolojisini ve yapısını kısmen korumaktadır. Uygulanan diğer yoğunluklarda ise çekirdek morfolojisinde apoptotik etkiler gözlemlenmektedir (Şekil 3.26.).



Şekil 3.26. Giroforik asit bileşiğinin $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına maruz bırakılmış HaCaT hücrelerinin genetik materyali üzerine etkisi (100x)
A) Kontrol B) DMSO C) $25 \mu\text{M}$ D) $50 \mu\text{M}$ E) $100 \mu\text{M}$ F) $200 \mu\text{M}$ G) $400 \mu\text{M}$ H) $800 \mu\text{M}$

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya genelinde, açık tenli insanlarda gözlemlenen kanser olguları içinde en çok rastlanan olgu, deri kanseri vakaları olarak ön plana çıkmaktadır. Bu bağlamda, deri kanseri etkeni olan ultraviyole ışınlar karşı koruyucu faktörlerin keşfi ve geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir (Narayanan ve ark. 2010).

Ultraviyole ışınlar, UV-A (320-400 nm), UV-B (290-320 nm) ve UV-C (100-290 nm) olarak üç grup altında incelenmekte ve UV-C ışınları atmosferdeki ozon tabakası tarafından absorbe edilerek dünyaya ulaşmaları engellenmektedir. UV-A ve UV-B ışınları ise dünya yüzeyine ulaşarak insanları ve diğer canlıları etkilemektedir. UV-A ışınları dalga boyu yüksek ışınlar oldukları için insan derisinde, dermis tabakası içine kadar nüfus ederek kollojen ve fibroblast yapılarında hasara neden olmakta, dolayısıyla deride çillenme ve yaşlanma gibi etkiler yaratmaktadır. UV-B ışınları ise deride epidermis ve dermisin üst kısımlarını etkileyerek; kızarıklıklara, güneş yanıklarına ve deri kanserine neden olmaktadır (Poquet ve ark. 2008; Moyal ve Fourtanier 2008; Narayanan ve ark. 2010; Seit   ve ark. 2010; Swalwell ve ark. 2012;). Bu nedenle UV-B ışınlarının insan üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarda; HaCaT (insan keratinosit) hücreleri, epidermisin stratum germinativum tabakasından izole edilmiş olmaları nedeniyle en başarılı model olmuşlardır (Boukamp ve ark. 1997; Engel ve ark. 2007; Poquet ve ark. 2008; Bae ve ark. 2010;).

Liken asitlerinin ultraviyole ışınlar karşı koruyucu özellikte olmaları ve güneş kremleri için etken madde olabilme potansiyelleri ise likenlerin dünya üzerindeki varoluş tarihleri nedeniyle ultraviyole ışınlarına adaptasyon sağlayarak fotobiyont ortağın korunması gerekliliğine veya izole edilen bazı sekonder metabolitlerin kimyasal olarak UV ışınlarına karşı filtre olabilecek yapıya sahip olmalarıyla ilişkili gözükmektedir (Fern ndez ve ark. 1998; Chen ve ark. 2000; Müller 2001; Hidalgo ve ark. 2002; Yuan ve ark. 2005; Podterob 2008; Moln r ve Farkas 2010).

UV-B ışınlarının; fotosentezi inhibe edici, ROS birikimi etkeni ve DNA üzerine mutasyon oluşturuıcı özelliklere sahip olduğu göz önünde bulundurulduğunda; bazı liken asitlerinin, fotobiyont ortağı korumak üzere UV-B ışınlarına karşı filtre özelliğinde olabileceğinin düşünülmesi gereklidir (Koç ve Üstün 2008; Molnár ve Farkas 2010; Molnár ve Farkas 2011).

Sekonder metabolitlerin ultraviyole ışınlara karşı filtre görevi görebilecekleri; kalisin, rizokarpik asit, atranorin, parietin, pinastrik asit, melanin bileşikleri üzerine yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Fernández ve ark. 1998; Solhaug ve ark. 2003; Nybakken ve Julkunen-Tiitto 2006; Molnár ve Farkas 2010). Ancak; uygulanan yöntemler nedeniyle ultraviyole ışınlara karşı filtre görevi gören bu liken asitlerinin insan hücreleri için koruyucu olup olamayacağı belirlenememiştir. Bununla birlikte, usnik asidin insan lenfosit hücreleri üzerine farklı dozlarda UV-B ışınlarına karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. Fakat uygulanan UV-B dozları ve usnik asit dozları düşüktür, dolayısıyla uygulanan deneylerde usnik asit bileşiğinin koruyucu olduğu belirlenebilirken toksik etkilerini gözlemlenme ihtimali ortadan kalkmıştır. Ayrıca, inkübasyon süresinin 48 saat gibi uzun bir süre oluşu hücre savunma mekanizmalarının devreye girmesi ile usnik asit bileşiğinin etkinliğini kaybetmesi veya medyum içeriğı ile etkileşime girme gibi sonuçlar oluşturabilmektedir (Kohlhardt-Floehr ve ark. 2010). Bir diğerk çalışmada ise *Usnea barbata* özütünün, %4 usnik asit içeriğı ile UV-B ışınlarına karşı koruyuculuğı test edilmiştir, ancak bu çalışma da liken özütü farklı bileşenler içerdiği için, usnik asit bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı koruyucu olduğunu belirleyecek nitelikte değildir (Engel ve ark. 2007). Bu çalışma kapsamında, UV-B ışınlarının insan hücreleri üzerine etkilerine karşı koruyucu aktiviteleri test edilen; atranorin, vulpinik asit ve giroforik asit bileşikleri hakkında benzer bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Uygulanan deney yöntemi ise UV-B ışınlarına karşı insan hücrelerini koruyucu etkisi incelenen çeşitli test bileşikleri için uygulanmış prosedürlerin modifiye edilmiş bir kombinasyonu durumundadır (Hernandez-Pigeon ve ark. 2006; Poquet ve ark. 2008; Zanatta ve ark. 2010).

(-)- usnik asit bileşiğinin, HaCaT hücreleri için IC_{50} dozu olan $2,5 \text{ J/cm}^2$ UV-B ışınına karşı koruyucu aktivitelerinin incelendiği bu tez çalışmasında; (-)- usnik asit bileşiğinin farklı konsantrasyonlarının toplamda 2 saat süresince hücreler üzerine uygulanması sonunda test bileşiğinin yüksek toksik özellikte olduğu MTT ve LDH testleriyle belirlenmiştir. (-) – usnik asidin yüksek toksik özelliğe sahip oluşu daha önceden yapılmış çalışmalarda da belirlenmiştir (Kumar ve Müller 1999; Koparal ve ark. 2006; Bačkorová ve ark. 2011). (-)- usnik asit bileşiğinin HaCaT hücrelerini UV-B ışınlarına karşı koruyucu özelliğinin belirlendiği çalışmalarda ise MTT testi sonuçlarına göre yoğunluğa bağlı sitotoksik özelliğin gözlemlenmesinin yanında, test bileşiğinin $100 \mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonunun UV-B ışınlarına ciddi anlamda filtre oluşturduğu gözlemlenmiştir. Yapılan LDH deneylerinde ise 50 ve $100 \mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlar UV-B ışınlarına filtre oluşturuyor gibi görünmektedir. Test bileşiğinin $50 \mu\text{M}$ yoğunluğundaki, dozunun MTT testinde spesifik bir etkisi gözlemlenmezken, LDH testinde LDH aktivitesi azaltıcı özellikte gözlemlenmesinin nedeni ise ölen ya da parçalanmış hücrelerin ve içeriklerinin, prosedürün uygulanması sırasında maddeli PBS ile birlikte uzaklaştırılması sonucu, yapılan LDH testinde laktat dehidrojenaz enzim aktivitesinin düşük çıkması olarak yorumlanabilmektedir. MTT ve LDH testlerinin farklı sonuçlar verebileceği daha önceden yapılmış çalışmalarda da belirlenmiştir (Fotakis ve Timbrell 2006). UV-B ışınları hücrelerde f-aktin komponentleri üzerine de etki göstermektedir (Chen ve ark. 2011). Bu kapsamda yapılan çalışmada ise 100 ve $200 \mu\text{M}$ 'lık test bileşiği konsantrasyonlarının f-aktin komponentlerinin depolimerize olmasını engellediği gözlemlenmiştir (Şekil 3.11.). UV-B ışınlarının apoptotik etkileri ise 25 ve $50 \mu\text{M}$ dozlarda gözlemlenmezken 100 ve $200 \mu\text{M}$ dozlarda kısmen apoptotik etkiler gözlemlenmektedir (Şekil 3.20.).

Çalışma sonucu elde edilen bilgiler ışığında, (-)- usnik asit bileşiğinin insan keratinosit hücreleri (HaCaT) üzerine sitotoksik etkilere sahip olduğu ve aynı zamanda UV-B ışınlarıyla etkileşimi sonucu toksisitesinde azalma meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 3.1.). UV-B ışınlarının insan keratinosit hücreleri üzerine; toksik, mutajen, hücre zarının yapısına zarar verici ve hücre iskeleti elemanı olan

f-aktin komponentlerinin polimerize yapısını depolimerize edici özellikleri, (-)-usnik asit bileşiğinin 25-100 μM yoğunlukları arasında değişen konsantrasyonları tarafından kısmen engellendiği düşünülmektedir. Ancak, (-) – usnik asit bileşiğinin aynı zamanda HaCaT hücreleri için toksik özelliklere sahip olması, UV-B ışınları ile etkileşim özelliğini gölgelemektedir. Bu nedenle; çok düşük konsantrasyonların UV-B ışınlarına karşı kullanımı söz konusu olabilir ancak düşük test bileşiği konsantrasyonları düşük miktarda UV-B ışınları ile etkileşime girebilecektir (Engel ve ark. 2007; Kohlhardt-Floehr ve ark. 2010;); bu durumda dahi test bileşiğinin toksik ve alerjen etkileri göz ardı edilmemeli, belki de UV-B koruyucu faktörler içinde sadece bir destek faktörü olarak çok düşük yoğunluklarda kullanımı düşünülmelidir (Aalto-Korte ve ark. 2005).

Atranorin bileşiğinin HaCaT hücrelerini UV-B ışınlarına karşı koruma potansiyelinin belirlenmesi amacıyla uygulanan çalışmalar sonucunda; test bileşiği MTT test verilerine göre HaCaT hücreleri üzerine yoğunluğa bağlı sitotoksik özelliğe sahiptir (Şekil 3.2.). LDH testi sonuçlarına göre ise 100 ve 200 μM yoğunluğundaki dozlar kısmi olarak UV-B ışınları sonucu oluşan laktat dehidrojenaz aktivitesini azaltmıştır (Şekil 3.6.).

Ayrıca, LDH testinde kısmi koruyucu etkileri gözlemlenen 100 ve 200 μM yoğunluğundaki dozların, HaCaT hücrelerinin f-aktin komponentlerini de UV-B ışınlarına karşı koruduğu belirlenmiştir (Şekil 3.13.). Benzer şekilde 100 μM atranorin dozu UV-B nedeniyle oluşan apoptotik etkileri de kısmen engellemiştir. Atranorin bileşiğinin DNA yapısını koruyucu etkisi, reaktif oksijen türlerini süpürücü, antioksidan etkisiyle bağlantılı gibi görünmektedir, çünkü UV-B ışını ile oluşan ROS birikimi DNA yapısını ve nükleik asit yapılarını değiştirici olarak görev almaktadır (Şekil 3.21.) (Melo ve ark. 2011).

Bu bilgiler ışığında atranorin bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı bir filtre görevi görebilecek kapasitede olduğu düşünülmekte, ancak HaCaT hücreleri üzerine yoğunluğa bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği anlaşılmaktadır. (-) – usnik asit bileşiği ile karşılaştırıldığında atranorin bileşiği daha az toksik

kapasiteye sahiptir. Fakat insan hücrelerini UV-B ışınlarına karşı koruyucu etken bileşik olarak kullanılma potansiyeli (-)- usnik asit gibi değerlendirilerek alerjen ve toksik etkileri nedeniyle UV koruyucu faktörlere yardımcı bir faktör olarak düşük dozlarda kullanılabilecek bir faktör olarak düşünülmelidir (Aalto-Korte ve ark. 2005; Molnár ve Farkas 2010).

Giroforik asit üzerine yapılan MTT testleri sonucunda, HaCaT hücreleri üzerine düşük sitotoksik özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. 2,5 J/cm² UV-B ışınlarına karşı koruyucu etkileri ise atranorin ve (-)- usnik asitten farklı olarak hücreleri kısmi koruyucu değil tamamen koruyarak hücre azalmasını engelleyici niteliktedir. Uygulanan farklı test bileşiği konsantrasyonlarının 400 µM yoğunluğa kadar doza bağlı olarak, UV-B ışınlarının hücreler üzerine olan toksisitesini azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.4.).

LDH aktivite ölçümleri sonucuna göre ise 50-100-200 µM'lık giroforik asit konsantrasyonlarının UV-B ışınları sonucunda oluşan hücre zarı hasarını ve hücre ölümünü engellediği belirlenmiştir (Şekil 3.8.). Benzer şekilde, 100 ve 200 µM'lık giroforik asit bileşiği konsantrasyonlarının UV-B ışınları nedeniyle oluşabilecek f-aktin depolimerizasyonunu engellediği belirlenmiştir (Şekil 3.17.). Fakat UV-B ışınları sonucu oluşan apoptotik etkiler kısmi olarak engellenebilmektedir, bu durumun nedenin ise giroforik asit bileşiğinin uygulanan konsantrasyonlarının antioksidan kapasitesinin, UV-B ışınları sonucu oluşan ROS birikimini süpürücü etkilerinin yeterli olmamasıyla ilişkilendirilebilir (Buçukoglu ve ark. 2012), (Şekil 3.25.).

Sonuç olarak, giroforik asit bileşiğinin insan keratinosit hücrelerini UV-B ışınlarına karşı, atranorin ve (-)- usnik asit bileşiklerine kıyasla çok daha iyi bir koruyucu olduğu gözlemlenmektedir. Bu bağlamda giroforik asit bileşiği UV-B ışınlarına karşı insan deri hücrelerini koruyucu bir faktör olarak kullanılabilir özelliktedir.

Vulpinik asit bileşiğinin UV-B ışınlarına karşı koruyucu aktivitesinin incelediği testler sonucunda, MTT testi verilerine göre vulpinik asit bileşiği uygulanan yöntem ve konsantrasyonlar kapsamında HaCaT hücreleri için sitotoksik etkilere sahip değildir (Burlando ve ark. 2009).

UV-B ışınlarına karşı ise doza bağımlı olarak HaCaT hücrelerini koruyucu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.3.). Uygulanan LDH testide MTT sonuçlarını desteklemekte ve HaCaT hücrelerinin ve hücre zarlarının UV-B ışınlarına karşı korunduğu gözlemlenmektedir (Şekil 3.7.). Benzer şekilde, UV-B ışınlarının f-aktin komponentleri üzerindeki etkileri ve apoptotik etkileri uygulanan vulpinik asit dozları tarafından tamamen engellenmektedir (Şekil 3.15-3.24). Bununla birlikte, test bileşiğinin UV-B ışınlarıyla oluşan ROS birikimini engelleme potansiyeline sahip olmaması ilginçtir (Şekil 3.9.).

Reaktif oksijen türleri (ROS) birikiminin incelenmesi testi sonucuna göre vulpinik asit bileşiği ROS birikimini anlamlı şekilde artırıcı bir faktör olarak gözükmemekle birlikte, UV-B ışınları sonucu artan ROS birikimini engelleme kapasitesine de sahip değildir. Dolayısıyla, hücrelerde UV-B ışınlarıyla meydana gelen apoptotik oluşumları engelleme potansiyeli vulpinik asit için ROS birikimini engelleme kapasitesiyle ilgisiz gözükmemektedir. Bununla birlikte, vulpnik asit bileşiğinin antioksidan özelliğinin alternatif test yöntemleriyle incelenmesinde fayda vardır. Sonuç olarak, vulpinik asit bileşiği incelenen liken asitleri içinde, UV-B ışınlarının etkilerinden insan keratinosit hücrelerini koruma kapasitesi en yüksek bileşik olarak belirlenmiştir.

Liken asitlerinin UV-B ışınlarına karşı insan keratinosit hücrelerini koruma kapasitesinin incelendiği bu tez çalışmasında; (-)- usnik asit, atranorin, giroforik asit ve vulpinik asit bileşiklerinin tamamının UV-B ışınlarını absorbe ve filtre etme kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda (-)- usnik asit, atranorin ve giroforik asitin azalan sırayla HaCaT hücreleri üzerine sitotoksik etkilere sahip olduğu, ancak vulpinik asitin sitotoksik özellikte olmadığı bulunmuştur. Elde edilen veriler ışığında, (-)- usnik asit ve atranorin UV-B

ışınlarına karşı koruyucu bir faktörden ziyade düşük dozlarda uygulanabilecek yardımcı birer etken bileşik olarak gözükmektedir.

Giroforik asit ve vulpinik asit ise güçlü UV-B filtreleyicileri ve koruyucuları olarak gelecek vadeden ve etkili birer UV-B koruyucu faktör özelliği taşımaktadır. Ayrıca, bu liken asitlerinin antiviral, antifungal ve antimikrobiyal etkilere sahip olması, UV-B koruyucu etkileriyle birlikte kombine olarak, tek etken bileşiklerle birden çok etki yaratılmasını sağlayacaktır (Lauterwein ve ark. 1995; Candan ve ark. 2006; Molnár ve Farkas 2010). Bu bağlamda, endüstriyel UV-B koruyucu faktör olarak üretilmeleri için bu bileşiklerin sentetik ve uygun maliyetli olarak üretilme yöntemlerinin geliştirilmesinde ve izole edilen doğal türevleri ile karşılaştırmalı olarak biyoaktivitelerinin araştırılmasında fayda vardır.

KAYNAKLAR

- Aalto-Korte, K., Lauerma, A. ve Alanko, K. (2005), "Occupational allergic contact dermatitis from lichens in present-day Finland," *Contact Dermatitis*, **52**, 36–38.
- Aprile, G., Catalano, I., Migliozi, A. ve Mingo, A. (2001), "Monitoring epiphytic lichen biodiversity to detect environmental quality and air pollution: the case study of Roccamonfina park (Campania Region-Italy)," *Air Pollution-New Developments*, **10**, 227-245
- Armstrong, R. ve Welch, A. (2007), "Competition in lichen communities," *Symbiosis*, **43**, 1–12.
- Bae, J. Y., Choi, J. S., Kang, S. W., Lee, Y. J., Park, J. ve Kang, Y. H. (2010), "Dietary compound ellagic acid alleviates skin wrinkle and inflammation induced by UV-B irradiation," *Experimental Dermatology*, **19**, 182–190.
- Bačkorová, M., Bačkor, M., Mikeš, J., Jendželovský, R. ve Fedoročko, P. (2011), "Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid," *Toxicology in Vitro*, **25**, 37–44.
- Bačkorová, M., Jendželovský, R., Kello, M., Bačkor, M., Mikeš, J. ve Fedoročko, P. (2012), "Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines," *Toxicology in Vitro*, **26**, 462–468.
- Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A. ve Makhija, U. (2006), "Experimental studies on the growth and usnic acid production in "lichen" *Usnea ghattensis in vitro*," *Microbiological Research*, **161**, 232–237.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. ve Fusenig, N. E. (1988), "Normal keratinization in a spontaneously immortalized," *The Journal of Cell Biology*, **106**, 761–771.
- Boukamp, P., Popp, S., Altmeyer, S., Hülsen, A., Fasching, C., Cremer, T. ve Fusenig, N. E. (1997), "Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT," *Genes, Chromosomes and Cancer*, **19**, 201–214.
- Boustie, J. ve Grube, M. (2005), "Lichens - a promising source of bioactive secondary metabolites," *Plant Genetic Resources*, **3**, 273–287.

- Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F. ve Verotta, L. (2009), "Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds," *Planta Medica*, **75**, 607–613.
- Buçukoglu, T. Z., Albayrak, S., Halici, M. G. ve Tay, T. (2012), "Antimicrobial and antioxidant activities of extracts and lichen acids obtained from some umbilicaria species from Central Anatolia, Turkey," *Journal of Food Processing and Preservation*, **21**, 1745-1749.
- Candan, M., Yilmaz, M., Tay, T., Kivanç, M. ve Türk, H. (2006), "Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Xanthoparmelia pokornyi* and its gyrophoric and stenoporic acid constituents," *Zeitschrift für Naturforschung C*, **61**, 319–23.
- Cetin, H., Tufan-Cetin, O. ve Turk, A. (2012), "Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae)," *Natural Product Research*, **26**, 37–41.
- Chen, H., Zhai, J., Du, M. ve Han, R. (2011), "Influence of enhanced UV-B radiation on f-actin in wheat division cells," *Plant Diversity and Resources*, **33**, 306–310.
- Chen, J., Blume, H. P. ve Beyer, L. (2000), "Weathering of rocks induced by lichen colonization — a review," *Catena*, **39**, 121–146.
- Chen, L., Xie, M., Bi, Y., Wang, G., Deng, S. ve Liu, Y. (2012), "The combined effects of UV-B radiation and herbicides on photosynthesis, antioxidant enzymes and DNA damage in two bloom-forming cyanobacteria," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **80**, 224–230.
- Chen, Z., Juneau, P. ve Qiu, B. (2007), "Effects of three pesticides on the growth, photosynthesis and photoinhibition of the edible cyanobacterium Ge-Xian-Mi (Nostoc)," *Aquatic toxicology*, **81**, 256–265.
- Choi, H., Kim, D., Kim, J. W., Ngadiran, S., Sarmidi, M. R. ve Park, C. S. (2010), "*Labisia pumila* extract protects skin cells from photoaging caused by UVB irradiation," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **109**, 291–296.
- Chooi, Y. H., Stalker, D. M., Davis, M., Fujii, I., Elix, J., Louwhoff, S. H. J. ve Lawrie, A. C. (2008), "Cloning and sequence characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from the lichen *Xanthoparmelia semiviridis*," *Mycological Research*, **112**, 147–161.
- Cocchietto, M., Skert, N., Nimis, P. ve Sava, G. (2002), "A review on usnic acid, an interesting natural compound," *Naturwissenschaften*, **89**, 137–146.

- Cockell, C. S. ve Knowland, J. (1999), "Ultraviolet radiation screening compounds," *Biological Reviews*, **74**, 311–345.
- Dobson, F. S. (2005), *Lichens. An illustrated guide to the British and Irish species*, Richmond Publishing Co.Ltd., Londra, İngiltere.
- Engel, K., Schmidt, U., Reuter, J., Weckesser, S., Simon-Haarhaus, B. ve Schempp, C. M. (2007), "*Usnea barbata* extract prevents ultraviolet-B induced prostaglandin E2 synthesis and COX-2 expression in HaCaT keratinocytes," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **89**, 9–14.
- Fahselt, D. (1993), "UV absorbance by thallus extracts of umbilicate lichens," *The Lichenologist*, **25**, 415–422.
- Fernández, E., Reyes, A., Hidalgo, M. E. ve Quilhot, W. (1998), "Photoprotector capacity of lichen metabolites assessed through the inhibition of the 8-methoxypsoralen photobinding to protein," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **42**, 195–201.
- Fotakis, G. ve Timbrell, J. (2006), "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride," *Toxicology Letters*, **160**, 171–177.
- Fujiwara, H., Saito, S., Hitotsuyanagi, Y., Takeya, K. ve Ohizumi, Y. (2004), "RA-VII, a cyclic depsipeptide, changes the conformational structure of actin to cause G2 arrest by the inhibition of cytokinesis," *Cancer Letters*, **209**, 223–229.
- Gilbert, O. (2004), *Lichens naturally Scottish*, Scottish Natural Heritage, Perth, Scotland.
- Gläser, R., Navid, F., Schuller, W., Jantschitsch, C., Harder, J., Schröder, J. M., Schwarz, A. (2009), "UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes *in vitro* and *in vivo*," *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **123**, 1117–1123.
- Guo, L., Shi, Q., Fang, J. L., Mei, N., Ali, A., Lewis, S. M., Leakey, J. E. (2008), "Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity," *Journal of Environmental Science and Health Part C*, **26**, 317–338.
- Hager, A., Brunauer, G., Türk, R. ve Stocker-Wörgötter, E. (2008), "Production and bioactivity of common lichen metabolites as exemplified by *Heterodea muelleri* (Hampe) Nyl," *Journal of Chemical Ecology*, **34**, 113–120.

- Halıcı, M.G., Hawksworth, D. L., Candan, M. ve Türk, A. Ö. (2010), "A new lichenicolous species of *Capronia* (Ascomycota, Herpotrichiellaceae), with a key to the known lichenicolous species of the genus," *Fungal Diversity*, **40**, 37–40.
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R. ve Bullock, P. (2004), "Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening," *Toxicology in Vitro*, **18**, 703–710.
- Hauck, M., Jürgens, S. R., Willenbruch, K., Huneck, S. ve Leuschner, C. (2009), "Dissociation and metal-binding characteristics of yellow lichen substances suggest a relationship with site preferences of lichens," *Annals of Botany*, **103**, 13–22.
- He, Yu-Ying ve Häder, D. P. (2002), "UV-B-induced formation of reactive oxygen species and oxidative damage of the cyanobacterium *Anabaena* sp. protective effects of ascorbic acid and N-acetyl-L-cysteine," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **66**, 115–124.
- Hernandez-Pigeon, H., Jean, C., Charruyer, A., Haure, M. J., Titeux, M., Tonasso, L., Quillet-Mary, A. (2006), "Human keratinocytes acquire cellular cytotoxicity under UV-B irradiation," *The Journal of Biological Chemistry*, **281**, 13525–13532.
- Hidalgo, M.E., Fernández, E., Ponce, M., Rubio, C. ve Quilhot, W. (2002), "Photophysical, photochemical, and thermodynamic properties of shikimic acid derivatives: calycin and rhizocarpic acid (lichens)," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **66**, 213–217.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, a., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K. (2003), "UV-induced skin damage," *Toxicology*, **189**, 21–39.
- Ingólfsdóttir, K. (2002), "Usnic acid," *Phytochemistry*, **61**, 729–736.
- Ingólfsdóttir, K., Gudmundsdóttir, G. F., Ogmundsdóttir, H. M., Paulus, K., Haraldsdóttir, S., Kristinsson, H. ve Bauer, R. (2002), "Effects of tenuiorin and methyl orsellinate from the lichen *Peltigera leucophlebia* on 5-15-lipoxygenases and proliferation of malignant cell lines *in vitro*," *Phytomedicine*, **9**, 654–8.
- Iovine, B., Nino, M., Irace, C., Bevilacqua, M. A. ve Monfrecola, G. (2009), "Ultraviolet B and A irradiation induces fibromodulin expression in human fibroblasts *in vitro*," *Biochimie*, **91**, 364–372.

- Iqbal, M., Aleem, M., Ijaz, A., Rehman, H. ve Yousaf, M. S. (2010), "Assessment of buffalo semen with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction assay," *Journal of Animal Science*, **88**, 922–925.
- Jaszczyszyn, A. ve Gasiorowski, K. (2008), "Limitations of the MTT assay in cell viability testing," *Adv. Clin. Exp. Med*, **17**, 525–529.
- Józwiak, M. A. ve Józwiak, M. (2009), "Influence of cement industry on accumulation of heavy metals in bioindicators", *Ecological Chemistry and Engineering*, **16**, 323-334.
- Kohlhardt-Floehr, C., Boehm, F., Troppens, S., Lademann, J. ve Truscott, T. G. (2010), "Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation--studies on human cells," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **101**, 97–102.
- Koparal, A. T., Tüylü, B. A. ve Türk, H. (2006), "In vitro cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes," *Natural Product Research*, **20**, 1300–1307.
- Koparal, A. T., Ulus, G. ve Zeytinoğlu, M. (2010), "Angiogenesis inhibition by a lichen compound olivetoric acid," *Phytotherapy Research*, **758**, 754–758.
- Kováčik, J., Klejdus, B., Stork, F. ve Malčovská, S. (2011), "Sensitivity of *Xanthoria parietina* to UV-A: role of metabolic modulators," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **103**, 243–250.
- Koç, E. ve Üstün, A. (2008), "Patojenlere karşı bitkilerde savunma ve antioksidanlar," *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **24**, 82–100.
- Kumar, A., Tyagi, M. B. ve Jha, P. N. (2004), "Evidences showing ultraviolet-B radiation-induced damage of DNA in cyanobacteria and its detection by PCR assay," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **318**, 1025–1030.
- Kumar, K. C. ve Müller, K. (1999), "Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth," *Journal of Natural Products*, **62**, 821–823.
- Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T. ve Marre, R. (1995), "In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid , (+) -usnic acid , and (-) -usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **39**, 2541–2543.

- Le, A., Cooper, C. R., Gouw, A. M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L. M., Royer, R. E. (2010), "Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 2037–2042.
- Liu, Y., Peterson, D., Hideo, K. ve David, S. (1997), "Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction," *Journal of Neurochemistry*, **69**, 581–593.
- Macias, F. ve Molinillo, J. (2007), "Allelopathy—a natural alternative for weed control," *Pest Management Science*, **348**, 327–348.
- Manerba, M., Vettraino, M., Fiume, L., Di Stefano, G., Sartini, A., Giacomini, E., Buonfiglio, R. (2012), "Galloflavin (CAS 568-80-9): a novel inhibitor of lactate dehydrogenase," *Chemmedchem*, **7**, 311–317.
- Mazza, F. P. (1925), "Constitution and physical properties of vulpinic acid," *Rend. Accad. Sci. Napoli*, **31**, 182-190.
- Melo, M. G. D., Dos Santos, J. P. A., Serafini, M. R., Caregnato, F. F., Pasquali, M. A. D. B., Rabelo, T. K., Da Rocha, R. F. (2011), "Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite," *Toxicology in Vitro*, **25**, 462–468.
- Molnár, K. ve Farkas, E. (2011), *Biological activities of secondary lichen metabolites*.
http://www.zpok.zoldpok.hu/img_upload/c1ed1e710aa1f4ec96d01e3f84439473/09_Molnar_Katalin_english.pdf [Erişim Tarihi: Aralık 22, 2012].
- Molnár, K. ve Farkas, E. (2010), "Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review," *Zeitschrift für Naturforschung C*, **65**, 157–73.
- Mossmann, T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol Methods*, **65**, 55–63.
- Moyal, D. D. ve Fourtanier, A. M. (2008), "Broad-spectrum sunscreens provide better protection from solar ultraviolet-simulated radiation and natural sunlight-induced immunosuppression in human beings," *Journal of the American Academy of Dermatology*, **58**, 149–154.
- Müller, K. (2001), "Pharmaceutically relevant metabolites from lichens," *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**, 9–16.

- Narayanan, D. L., Saladi, R. N. ve Fox, J. L. (2010), "Ultraviolet radiation and skin cancer," *International Journal of Dermatology*, **49**, 978–986.
- Nybakken, L., Helmersen, A. M., Gauslaa, Y. ve Selås, V. (2010), "Lichen compounds restrain lichen feeding by bank voles (*Myodes glareolus*)," *Journal of Chemical Ecology*, **36**, 298–304.
- Nybakken, L. ve Julkunen-Tiitto, R. (2006), "UV-B induces usnic acid in reindeer lichens," *The Lichenologist*, **38**, 477.
- Offord, E. A., Gautier, J. C., Avanti, O., Scaletta, C., Runge, F., Krämer, K. ve Applegate, L. A. (2002), "Photoprotective potential of lycopene, B-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA irradiated human skin fibroblasts," *Free Radical Biology and Medicine*, **32(12)**, 1293–1303.
- Onat, A., İmal, M. ve İnan, A. (2004) "Soğutucu akışkanların ozon tabakası üzerine etkilerinin araştırılması ve alternatif soğutucu akışkanlar," *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, **7**, 32–38.
- Pauloin, T., Dutot, M., Joly, F., Warnet, J. M. ve Rat, P. (2009), "High molecular weight hyaluronan decreases UVB-induced apoptosis and inflammation in human epithelial corneal cells," *Molecular Vision*, **15**, 577–583.
- Podterob, A. (2008), "Chemical composition of lichens and their medical applications," *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **42**, 582–589.
- Poquet, L., Clifford, M. N. ve Williamson, G. (2008), "Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **476**, 196–204.
- Purvis, O. W. ve Pawlik-Skowronska, B. (2008), "Lichens and metals," *British Mycological Society*, **1**, 175–200.
- Rancan, F., Rosan, S., Boehm, K., Fernández, E., Hidalgo, M. E., Quihot, W., Rubio, C. (2002), "Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **68**, 133–139.
- Ribeiro-Costa, R. M., Alves, S. J., Santos, N. P., Nascimento, S. C., Gonçalves, E. C. P., Silva, N. H., Honda, N. K. (2004), "In vitro and in vivo properties of usnic acid encapsulated into PLGA-microspheres," *Journal of Microencapsulation*, **21**, 371–384.
- Richardson, D. H. S. (1999), "War in the world of lichens: parasitism and symbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi," *Mycological Research*, **103**, 641–650.

- Risuleo, G., Ciacciarelli, M., Castelli, M. ve Galati, G. (2009), "The synthetic inhibitor of fibroblast growth factor receptor PD166866 controls negatively the growth of tumor cells in culture," *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, **28**, 151.
- Rozema, J., Björn, L. O., Bornman, J. F., Gaberscik, A., Häder, D. P., Trost, T. ve Germ, M. (2002), "The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems--an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds," *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, **66**, 2–12.
- Russo, A., Piovano, M., Lombardo, L., Garbarino, J. ve Cardile, V. (2008), "Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells," *Life Sciences*, **83**, 468–474.
- Şafak, B., Çiftci, I. ve Özdemir, M. (2009), "In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of usnic acid," *Phytotherapy Research*, **957**, 955–957.
- Scharffetter, K., Wlaschek, M., Hogg, A., Bolsen, K., Schothorst, A., Goerz, G. ve Krieg, T. (1991), "UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo," *Archives of Dermatological Research*, **283**, 506–511.
- Seité, S., Fourtanier, A., Moyal, D. ve Young, R. (2010), "Photodamage to human skin by suberythral exposure to solar ultraviolet radiation can be attenuated by sunscreens: a review," *The British Journal of Dermatology*, **163**, 903–914.
- Smith, S. M., Wunder, M. B., Norris, D. ve Shellman, Y. G. (2011), "A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time," *Plos One*, **6**, 26908.
- Solhaug, K. A., Gauslaa, Y., Nybakken, L. ve Bilger, W. (2003), "UV-induction of sun-screening pigments in lichens," *New Phytologist*, **158**, 91–100.
- Stocker-Wörgötter, E. (2008), "Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes," *Natural Product Reports*, **25**, 188–200.
- Swalwell, H., Latimer, J., Haywood, R. M. ve Birch-Machin, M. A. (2012), "Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells," *Free Radical Biology and Medicine*, **52**, 626–634.

- Tarozzi, A., Marched, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Andrisano, V., Fiori, J., Cantelli-forti, G. (2005), "Protective effects of cyanidin-3-O-B-glucopyranoside against UVA-induced oxidative stress in human keratinocytes," *Photochemistry and Photobiology*, **81**, 623–629.
- Tsuda, K. (2012), "Associations of oxidative stress and inflammation and their role in the regulation of membrane fluidity of red blood cells in hypertensive and normotensive men: An electron spin resonance investigation," *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **3**, 1020–1027.
- Türk, A. O., Yilmaz, M., Kivanç, M. ve Türk, H. (2003), "The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent," *Zeitschrift für Naturforschung C*, **58**, 850–854.
- Türk, H., Yilmaz, M., Tay, T., Türk, A. O. ve Kivanç, M. (2006), "Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin, and olivetoric acid constituents," *Zeitschrift für Naturforschung C*, **61**, 499–507.
- Valarmathi, R., Hariharan, G. N., Venkataraman, G. ve Parida, A. (2009), "Characterization of a non-reducing polyketide synthase gene from lichen *Dirinaria applanata*," *Phytochemistry*, **70**, 721–729.
- Valencia-Islas, N., Zambrano, A. ve Rojas, J.L. (2007), "Ozone reactivity and free radical scavenging behavior of phenolic secondary metabolites in lichens exposed to chronic oxidant air pollution from Mexico City," *Journal of Chemical Ecology*, **33**, 1619–1634.
- Wang, G., Chen, K., Chen, L., Hu, C., Zhang, D. ve Liu, Y. (2008), "The involvement of the antioxidant system in protection of desert cyanobacterium *Nostoc sp.* against UV-B radiation and the effects of exogenous antioxidants," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **69**, 150–157.
- Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D. ve Wang, X. (2010), "An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells," *Journal of Microbiological Methods*, **82**, 330–333.
- Wu, B., Zhu, J. ve Zhang, Y. (2008), "Predictive value of MTT assay as an *in vitro* chemosensitivity testing for gastric cancer: One institution's experience," *World Journal of Gastroenterology*, **14**, 3064–3068.
- Xia, J., Li, Y. ve Zou, D. (2004), "Effects of salinity stress on PSII in *Ulva lactuca* as probed by chlorophyll fluorescence measurements," *Aquatic Botany*, **80**, 129–137.

- Xiong, F. (2001), "Evidence that UV-B tolerance of the photosynthetic apparatus in microalgae is related to the D1-turnover mediated repair cycle *in vivo*," *Journal of plant physiology*, **158**, 285–294.
- Yilmaz, M., Türk, A. O., Tay, T. ve Kivanç, M. (2004), "The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents," *Zeitschrift für Naturforschung C*, **59**, 249–54.
- Yuan, X., Xiao, S. ve Taylor, T.N. (2005), "Lichen-like symbiosis 600 million years ago," *Science*, **308**, 1017–1020.
- Zanatta, C.F., Mitjans, M., Urgatondo, V., Rocha-Filho, P. ve Vinardell, M. P. (2010), "Photoprotective potential of emulsions formulated with buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines," *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 70–75.
- Zhang, F., Wang, N., Kong, J., Dai, J., Chang, F., Feng, G. ve Bi, S. (2011), "Multi-walled carbon nanotubes decrease lactate dehydrogenase activity in enzymatic reaction," *Bioelectrochemistry*, **82**, 74–78.